

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
der Medizinischen Fakultät der Universität München
ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. K. Meßmer
jetziger Direktor: Prof. Dr. A. Baethmann

In-vitro-Modell eines xenogenen Systems:
Chronische Wirkungen induzierter versus präformierter Antikörper auf
Herzmuskelzellkulturen von neonatalen Ratten

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Arnd E. Autenrieth
aus Lexington, Ky./ USA

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. C. Hammer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Bartels
	Prof. Dr. C. von Schacky
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Frau PD Dr. U. Müller-Werdan
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	29.07.2004

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer und Herrn Prof. Dr. med. K. Werdan für die Überlassung des interessanten Themas und die stete Unterstützung bei der Lösung aller praktischen und theoretischen Probleme sowie das Bieten von Arbeitsmöglichkeiten in Ihren Laboratorien.

Besonderer Dank gilt auch Frau PD Dr. med. U. Müller-Werdan für Ihre Betreuung, Anleitung und die jederzeitige Bereitschaft, bei der Lösung von auftauchenden Problemen zu helfen.

Außerdem danke ich Herrn Dr. med. vet. D. Klein für die Einarbeitung in die Methodik und Thematik der vorliegenden Arbeit und allen Mitarbeitern des Institutes für Chirurgische Forschung und der Medizinischen Klinik I des Klinikums Großhadern der Universität München für die allzeit gute Zusammenarbeit.

1. EINLEITUNG	9
1.1.1. Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit.....	11
2. MATERIAL UND METHODEN	12
2.1. PRÄPARATION UND KULTIVIERUNG VON NEONATALEN RATTENKARDIOMYOZYTEN.....	12
2.1.1. Präparation der Zellen.....	12
2.1.2. Kultivierung der Zellen	15
2.2. GEWINNUNG UND AUFBEREITUNG DER SEREN	15
2.2.1. Gewinnung von humanem Blut	15
2.2.2. Gewinnung von Blut mit induzierten Antikörpern	15
2.2.3. Aufbereitung des Blutes.....	16
2.2.4. Gewinnung von Rattenerythrozyten	16
2.2.5. Antikörperabsorption	16
2.2.6. Seruminaktivierung	17
2.2.7. Dialyse des Serums.....	17
2.3. KONTROLLE DER SERUMQUALITÄT	17
2.3.1. Bestimmung des Hämagglutinationstiter.....	17
2.3.2. Bikarbonat-Bestimmung.....	18
2.3.3. Bestimmung der Konzentrationen von Natrium, Kalium und Kalzium.....	18
2.4. BESTIMMUNG DER KONTRAKTILITÄTSPARAMETER	18
2.4.1. Aufbau der Messapparatur	18
2.4.2. Bestimmung der Kontraktionsparameter	19
2.4.3. Inkubation der Kardiomyozyten mit induzierten Antikörpern in verschiedenen Verdünnungen oder in verschiedenen Serumaufbereitungen.....	22
2.5. ZYTOTOXIZITÄTSPARAMETER	24
2.5.1. Proteinbestimmung nach Lowry.....	24
2.5.2. Kaliummessung	24
2.5.3. Messung von energiereichen Phosphaten mit der HPLC	25
2.5.4. Trypanblaufärbung.....	25
2.5.5. Elektronenmikroskopische Untersuchung.....	26
2.6. EINFLUSS VON PNAK AUF KARDIOMYOZYTEN BEI INKUBATION BIS ZU 24 STUNDEN...	27
2.6.1. Frequenzbestimmung	27
2.7. AUSWIRKUNGEN DER PNAK AUF DEN STICKOXID-STOFFWECHSEL	27
2.7.1. Versuchsaufbau	27
2.7.2. Nitritmessung	28
2.8. EINFLUSS VON IMMUNGLOBULINLÖSUNGEN AUF DIE HERZMUSKELZELLEN.....	28
2.9. MATERIALIEN UND INKUBATIONSLSÖSUNGEN	28
2.9.1. Verwendete Materialien	28
2.9.2. Verwendete Inkubationslösungen.....	29
2.10. STATISTISCHE METHODEN	30
2.10.1. Multiple Vergleiche nach Scheffé.....	30
2.10.2. Varianzanalyse nach Hartley.....	31
2.10.3. U-Test nach Mann-Whitney	31
2.10.4. Der Variationskoeffizient	32
2.10.5. Prüfung der Gleichheit mehrerer Varianzen nach Cochran.....	32
2.10.6. Multiple Vergleiche nach Nemenyi	32

3. ERGEBNISSE	33
3.1. KONTROLLE DER SERUMQUALITÄT	33
3.1.1. <i>Serumparameter vor der Dialyse</i>	33
3.1.2. <i>Serumparameter nach der Dialyse</i>	34
3.2. EINFLUSS DER INDUZIERTEN ANTIKÖRPER	36
3.2.1. <i>Kontraktilitätsparameter bei Inkubation bis 30 min.</i>	36
3.2.1.1. Kontrollversuch	36
3.2.1.2. Auswirkungen induzierter Antikörper auf die Chronotropie der HMZ	37
3.2.1.3. Die Auswirkung der induzierten Antikörper auf weitere Kontraktionsparameter	40
3.2.2. <i>Frequenzverhalten bei Inkubation über 60 min. in Abhängigkeit von der Serumkonzentration</i>	43
3.2.3. <i>Einfluss von unterschiedlichen Serumaufbereitungen auf die Zellen</i>	45
3.2.4. <i>Frequenzverhalten bei Inkubation über vier Stunden in Abhängigkeit von der Serumkonzentration</i>	46
3.2.5. <i>Verhalten der Zellen bei Inkubation über 24 Stunden bei hoher Serumverdünnung</i>	49
3.3. ZYTOTOXIZITÄT DER IAK UND PNAK IM VERGLEICH	49
3.3.1. <i>Proteinbestimmung nach Lowry</i>	49
3.3.2. <i>Kalium pro Protein</i>	53
3.3.3. <i>Messung der energiereichen Phosphate mit der HPLC</i>	57
3.3.4. <i>Trypanblauausschlussmethode</i>	58
3.3.5. <i>Elektronenmikroskopie</i>	60
3.4. EINFLUSS DER PNAK BEI INKUBATION BIS ZU 24 STUNDEN	65
3.4.1. <i>Chronischer Effekt von xenogenem Serum auf die Frequenz</i>	65
3.4.2. <i>Chronischer Effekt von xenogenem Serum auf die Synchronizität des Schlagverhaltens</i>	67
3.4.3. <i>Konzentrationsabhängigkeit des dissoziierenden Effekts der PNAk</i>	74
3.4.4. <i>Einfluss verschiedener Serumaufbereitungen der PNAk auf die Frequenz</i>	75
3.5. EINFLUSS DER PNAK AUF DEN STICKOXIDSTOFFWECHSEL	80
3.5.1. <i>Die Stickoxidproduktion in Abhängigkeit von der Zeit</i>	80
3.5.2. <i>Die Stickoxidproduktion in Abhängigkeit von der PNAk-Konzentration</i>	81
3.6. EINFLUSS VON IMMUNGLOBULINLÖSUNGEN AUF DIE HERZMUSKELZELLEN	82
3.6.1.1. Auswirkungen der Immunglobulinlösungen auf die Chronotropie	82
3.6.1.2. Auswirkungen der Immunglobulinlösungen auf die Kontraktilitätsparameter	83
4. DISKUSSION	85
4.1. AKTIVE BESTANDTEILE UND QUALITÄT DER SEREN	85
4.1.1. <i>Serenauswahl und -aufbereitung</i>	85
4.1.2. <i>PNAk</i>	86
4.1.3. <i>IAk</i>	89
4.1.4. <i>Komplementsystem</i>	89
4.2. EINFLUSS DER INDUZIERTEN ANTIKÖRPER IM IN-VITRO-MODELL EINES XENOGENEN SYSTEMS	94
4.2.1. <i>Kontraktilitätsparameter bei Inkubation bis 30 min.</i>	94
4.2.1.1. Kontrollversuch	94
4.2.1.2. Auswirkungen der IAK auf die Chronotropie der HMZ	94
4.2.1.3. Kontraktionsparameter	96
4.2.2. <i>Einfluss der IAK auf die Frequenz in Abhängigkeit von der Konzentration</i>	97
4.2.3. <i>Einfluss unterschiedlicher Serumgruppen der IAK</i>	98

4.3.	ZYTOTOXIZITÄT DER IAK UND PNAK IM VERGLEICH	98
4.3.1.	<i>Diskussion der Ergebnisse der Proteinbestimmung</i>	98
4.3.2.	<i>Kaliumgehalt</i>	99
4.3.3.	<i>Messung der energiereichen Phosphate</i>	101
4.3.4.	<i>Trypanblau</i>	101
4.3.5.	<i>Elektronenmikroskopie.....</i>	102
4.4.	EINFLUSS DER PNAK IM IN-VITRO-MODELL EINES XENOGENEN SYSTEMS BEI INKUBATION BIS ZU 24 STUNDEN.....	102
4.4.1.	<i>Chronischer Effekt von xenogenem Serum auf die Frequenz</i>	102
4.4.2.	<i>Chronischer Effekt von xenogenem Serum auf die Synchronizität des Schlagverhaltens.....</i>	102
4.4.3.	<i>Konzentrationsabhängigkeit</i>	103
4.4.4.	<i>Einfluss verschiedener Serumaufbereitungen.....</i>	103
4.5.	EINFLUSS DER PNAK AUF DEN STICKOXIDSTOFFWECHSEL	104
4.5.1.	<i>HMZ und NO-Produktion.....</i>	104
4.5.2.	<i>Stickoxiddtproduktion in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration des XS</i>	104
4.6.	EINFLUSS VON IMMUNGLOBULINLÖSUNGEN AUF DIE HMZ.....	105
4.7.	ÜBERLEGUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DER PNAK.....	106
4.7.1.	<i>Physiologie der HMZ.....</i>	106
4.7.1.1.	<i>Aufbau der HMZ und der HMZ-Kulturen</i>	106
4.7.1.2.	<i>Das Aktionspotential der HMZ</i>	107
4.7.1.3.	<i>Die elektromechanische Kopplung und der Kontraktionsmechanismus</i>	108
4.7.1.4.	<i>Kommunikation der Zellen untereinander</i>	110
4.7.1.5.	<i>Beeinflussung der HMZ durch verschiedene Regelkreise</i>	110
4.7.2.	<i>Auswirkungen der PNAk und des Komplementsystems.....</i>	112
4.7.2.1.	<i>Stillstand und Veränderung der Kontraktionsparameter</i>	112
4.7.2.2.	<i>Desynchronisation.....</i>	114
4.8.	VORSCHLÄGE FÜR WEITERFÜHRENDE ARBEITEN	115
5.	ZUSAMMENFASSUNG	116
6.	LITERATURVERZEICHNIS	118

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CP	Kreatinphosphat
DAG	Diacylglycerol
Dia.	Diagramm
Fa.	Firma
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HMZ	Herzmuskelzellen
HXAR	hyperakute xenogene Abstoßungsreaktion
IAk	Serum, das induzierte Antikörper enthält
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
K-RHS	Serum eines mit Rattenherzsediment immunisierten Kaninchens
K-RZK	Serum eines mit HMZ aus Zellkultur immunisierten Kaninchens
kD	Kilo-Dalton
Ko	Kontrolle
MAC	Membrane attack complex
MHC	Major histocompatibility complex
µg	Mikrogramm
min.	Minute(n)
MW	Mittelwert
NO	Stickoxid

PBSAG	phosphate buffered saline A/glucose, kalzium- und magnesiumfrei
PCA	Perchlorsäure
PERV	Porcine endogene Retroviren
PNAk	Serum, das präformierte natürliche Antikörper enthält
s	Sekunde(n)
s.c.	subkutan
SHH	Humanes Serum (enthält präformierte natürliche Antikörper)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SM	synthetisches Medium
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SZ	Serumzugabe
Tab.	Tabelle
VK	Variationskoeffizient
XS	xenogenes Serum
Xsa	xenogenes Serum, absorbiert
XSia	xenogenes Serum, inaktiviert und absorbiert
XSi	xenogenes Serum, inaktiviert
'	Minuten
''	Sekunden

1. Einleitung

Unter Xenotransplantation versteht man die Übertragung von Organen, Geweben und Zellen zwischen Tierarten, bzw. von Tieren auf den Menschen.

Abgesehen von Organgröße und -form, sowie Körperhaltung des Spendertieres, müssen biochemische Charakteristika wie Oberflächenantigene und die Empfänglichkeit für Hormone möglichst ähnlich sein. Aus diesen Gründen böten sich nicht-humane Primaten als Spender an (Hammer 1994). Bei diesen Tiere sind die Barrieren, die für eine erfolgreiche Xenotransplantation überwunden werden müssen, am geringsten (Reemtsma et al. 1964). Neben der aufwendigen Zucht in ausreichender Menge und der möglichen Übertragung von Krankheitserregern (z.B. HIV- oder Ebolavirus) stehen diesem Ansinnen auch ethische Bedenken entgegen. Eine Alternative stellen Schweine dar, die vergleichsweise einfach zu züchten sind, ohnehin für die menschliche Nahrungsversorgung gehalten werden und zumindest in der Körpermasse den Menschen ähneln (Lexer et al. 1986, Hammer 1991). Der geringere phylogenetische Verwandtschaftsgrad bringt aber auch neue Probleme mit sich. Die Reaktion auf andersgeartete Hormone und Transmitter sowie die Folgen der Ausschüttung fremder Proteine durch das Organ sind heute noch nicht abzuschätzen (Hammer 1992a). Schweineherzen z.B. zeichnen sich bei ähnlicher Größe und Aktionspotential durch eine andere Innervation und Morphologie des AV-Knotens als beim Menschen aus (Hammer & Thein 2002). Zusätzlich zu den zellulären Abstoßungsphänomenen, die schon bei der Allotransplantation eine Rolle spielen, treten xenogene humorale Mechanismen der Abstoßung verstärkt in den Vordergrund. In diesem Fall spricht man von diskordanter Xenotransplantation im Gegensatz zur konkordanten, bei der die Abstoßung vor allem über zelluläre Mechanismen vermittelt wird (Calne 1970, Hammer 1991). Es gibt zwei verschiedene Arten von Antikörpern, die für die Xenotransplantation bedeutsam sind: die präformierten natürlichen Antikörper (PNAk) und die induzierten Antikörper (IAk). Induzierte Antikörper werden von der körpereigenen Abwehr nach Kontakt mit einem bestimmten Antigen gebildet. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den PNAk um Antikörper hoher Avidität und geringer Spezifität (Hammer 1987), die ohne vorherige spezifische Sensibilisierung gebildet werden. Der wesentliche Auslöser zur Bildung dieser Antikörper ist vermutlich der Kontakt mit der Darmflora (Hammer & Hingerle 1992). Je entfernter die phylogenetische Verwandtschaft zweier Spezies ist, desto mehr PNAk gegen die jeweils andere besitzen sie. Innerhalb einer zoologischen Familie gibt es keine PNAk (Hammer & Chaussy 1973). PNAk und IAk aktivieren das Komplementsystem über

den klassischen Reaktionsweg (Bergmann et al. 1990). Das Komplementsystem kann jedoch nicht nur über Antikörper aktiviert werden, sondern auch über den alternativen Reaktionsweg. Beides induziert eine hyperakute xenogene Transplantatabstoßungs-Reaktion (HXAR) (Johnston et al. 1991). In den letzten Jahren wird verstärkt versucht, diese HXAR durch gentechnische Veränderung der potentiellen Spendertiere zu vermeiden (Artrip et al. 1997). Verschiedene Systeme sind an der xenogenen Abstoßungsreaktion beteiligt: Zu nennen sind die natürliche Immunität durch präformierte Antikörper, die direkte Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg, im weiteren Verlauf auch IAK und schließlich eine Reihe von Mechanismen der zellulären Immunabwehr (Sakai et al. 1976, Sawyer et al. 1995, Platt 1996). Heute und in naher Zukunft erscheint die klinische Anwendung der Xenotransplantation auch durch den Einsatz neuer gentechnischer und immunologischer Methoden trotz aller Fortschritte nicht möglich (Lu et al. 1994, Sykes et al. 1994, Fabre 1995, Schumacher et al. 1995, Minanov et al. 1996, Pourcel et al. 1997). Beim Schwein bekannte porcine endogene Retroviren (PERV) (Patience et al. 1997) scheinen nicht von klinischer Relevanz zu sein. Das Übertragungsrisiko ist fraglich und bisher nicht gesichert (van der Laan et al. 2000, Specke et al. 2003). Auch die Aufzucht PERV-freier Schweine scheint möglich (Hammer 2003, Cooper 2003).

Transplantatabstoßung findet vor allem an den Endothelzellen der xenogenen Blutgefäße statt, die als erste mit der Abwehr des Empfängerorganismus in Berührung kommen. Bei der HXAR kommt es zur Aktivierung der Endothelzellen mit Freisetzung zahlreicher Mediatoren (Saumweber et al. 1992, Millan et al. 1994, Bach et al. 1995), Aggregation von Thrombozyten und Leukozyten (Rosenberg 1971) und Lyse der Zellen mit der Folge von Ödem, Hämorrhagie, Blutgerinnung und Thrombose (Hammer 1995). Sollte es gelingen, die destruktive Interaktion der Abwehrsysteme des Empfängerorganismus auf das Endothel zu verhindern, dann wird die Frage bedeutsam, ob und in welcher Weise die parenchymalen Zellen des transplantierten Organs beeinflusst werden. Die Hemmung der endothelvermittelten Abstoßungsreaktion alleine dürfte in vivo nicht ausreichend sein, um die Transplantatfunktion auf Dauer zu garantieren.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Wirkungen der xenogenen Antikörper unter Berücksichtigung des Komplementsystems auf funktionell aktive Parenchymzellen eines Organs untersucht werden. Als Modell dienen schlagende HMZ-Kulturen von neonatalen Ratten, an denen sich nicht nur biochemische Messungen vornehmen lassen, sondern durch Darstellung des

Schlagverhaltens auch physikalische Effekte der Antikörper direkt beobachten lassen. Diese Zellen stellen ein etabliertes Modell dar, mit dessen Hilfe die Effekte zahlreicher endogener und exogener Substanzen auf das Myokard untersucht wurden (Werdan et al. 1987, 1989, 1991, 1993, 1994). So konnte ein spezifisches und reproduzierbares Muster eines geänderten Schlagverhaltens dieser Kardiomyozyten nach Zugabe von Seren xenogener Spezies identifiziert werden: einige Sekunden nach Zugabe der xenogenen Seren kommt es zu einem minutenlangen Stillstand der spontanen Kontraktionen, der durch extrazelluläre elektrische Stimulation nicht unterbrochen werden kann; im Verlauf von Minuten kommt es – in der Gegenwart der xenogenen Seren – zu einem langsamen Wiederbeginn der spontanen Kontraktionen; werden zuvor die in den Seren enthaltenen präformierten Antikörper durch Absorption extrahiert, so tritt dieses Phänomen nicht mehr auf, während Komplementinaktivierung alleine nicht geeignet war, den vorübergehenden Stillstand der Spontankontraktilität zu verhindern (Müller-Werdan et al. 1994). Diese Beobachtungen waren der Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit, in der die chronische Wirkung von Seren mit PNAk auf die Funktion von Kardiomyozyten untersucht wurde. Im Vergleich mit durch eine spezifische Immunisierung gewonnenen IAK konnten Spezifika der Wirkung von PNAk auf Kardiomyozyten erarbeitet werden, die potentiell Relevanz für die in vivo Situation bei Xenotransplantation haben könnten.

1.1.1. Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass die PNAk akut zu einem reversiblen Stillstand spontan kontraktile Kardiomyozyten führen (Klein 1994). In der vorliegenden Arbeit wurden die chronischen Wirkungen der PNAk im Vergleich zu IAK untersucht. Im einzelnen wurden folgende Fragen angegangen:

1. Lösen IAK ähnliche Phänomene aus wie PNAk oder gibt es einen grundsätzlichen Unterschied in ihrer Wirkung auf das Kontraktionsverhalten der HMZ? Gibt es spezifische kardiodepressive Profile für IAK versus PNAk?
2. Wirken beide Antikörpertypen (PNAk oder IAK) bei Inkubation von 30 min. oder mehr zytotoxisch? Existieren diesbezüglich Unterschiede zwischen diesen distinkten Antikörpern? Welche Rolle spielt hierbei das Komplementsystem?
3. Ist gegebenenfalls das Komplementsystem an der Zytotoxizität beteiligt?
4. Aktivieren die PNAk Botensysteme der Zellen, speziell den Stickoxidstoffwechsel?

2. Material und Methoden

2.1. Präparation und Kultivierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten

2.1.1. Präparation der Zellen

Ein bis drei Tage alte Ratten werden durch Genickdruck getötet. Unter sterilen Kautelen im Laminar Flow (Edge Gard Hood, Baker Company Inc., Maine) wird deren noch schlagendes Herz aus dem Situs isoliert. Die anhaftenden Blutreste werden in eiskalter PBSAG-Lösung (siehe 2.9.2.) abgespült. Die Herzen werden in kleinste Stücke zerteilt, deren Kantenlängen weniger als einen Millimeter betragen. Diese Muskelfragmente werden sofort einer fraktionierten enzymatischen Behandlung unterzogen. Die dazu verwendete Enzymmischung enthält 0,12% Trypsin und 0,03% Kollagenase. Während zehnminütiger Inkubation in je 10 ml Lösung bei 37°C wird der Zellverband gelöst, die einzelnen Zellen jedoch nicht nachhaltig beschädigt. Die Zellsuspensionen, die aus den ersten drei Behandlungen stammen, werden verworfen, da in ihnen der Anteil von Zellfragmenten, Erythrozyten und Bindegewebszellen vergleichsweise hoch ist. Die nachfolgenden, Einzelzellen enthaltenden Suspensionen werden in Zentrifugenröhrchen verbracht, in denen sich je 2 ml steriles und eisgekühltes Züchtungsmedium (serumhaltiges CMRL, siehe 2.9.2) befinden. Durch die Kälte und den Serumgehalt des Züchtungsmediums wird die proteolytische Wirkung aufgehoben. Im Anschluss daran werden die Zellen zehn Minuten zentrifugiert (300 g) und der Überstand verworfen. Das zellhaltige Sediment wird in Züchtungsmedium (37°C) erneut in Suspension gebracht. Die Trennung der Kardiomyozyten von „non-muscle-cells“ erfolgt mittels der „differential attachment technique“ (DAT). Die Suspension wird in ein 175 cm² Kulturfläschchen (Nunclon Plastics, Dänemark) gefüllt und zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Während dieses Zeitraums heften sich die „Bindegewebszellen“ am Boden des Fläschchens an. Die Kardiomyozyten hingegen bleiben lose im Überstand und können so am Ende der Inkubationszeit gesondert abpipetiert werden. Nach Verdünnung mit Züchtungsmedium auf die erwünschte Zelldichte werden die Herzmuskelzellen erneut ausgesät.

Hierfür werden entsprechend der Zellkulturgefäße entweder 5 ml Zellsuspension pro Flaschen (Nunclon Plastics, Dänemark) oder 2 ml pro Loch (Falcon Plates, 6-well, Nr. 3846, Becton Dickinson, New Jersey) in einer Zelldichte von ca. 100 000 Zellen/cm² eingefüllt. Die Zellkulturen werden dann im Brutschrank bei 37°C und gesättigter Wasserdampf-Atmosphäre inkubiert. Da das verwendete Kulturmedium durch den Gehalt an HEPES und Phosphatpuffer eine hohe Pufferkapazität besitzt, ist es nicht notwendig, die Zellen in einer mit CO₂ angereicherten Luft in Bikarbonatpuffer zu züchten.

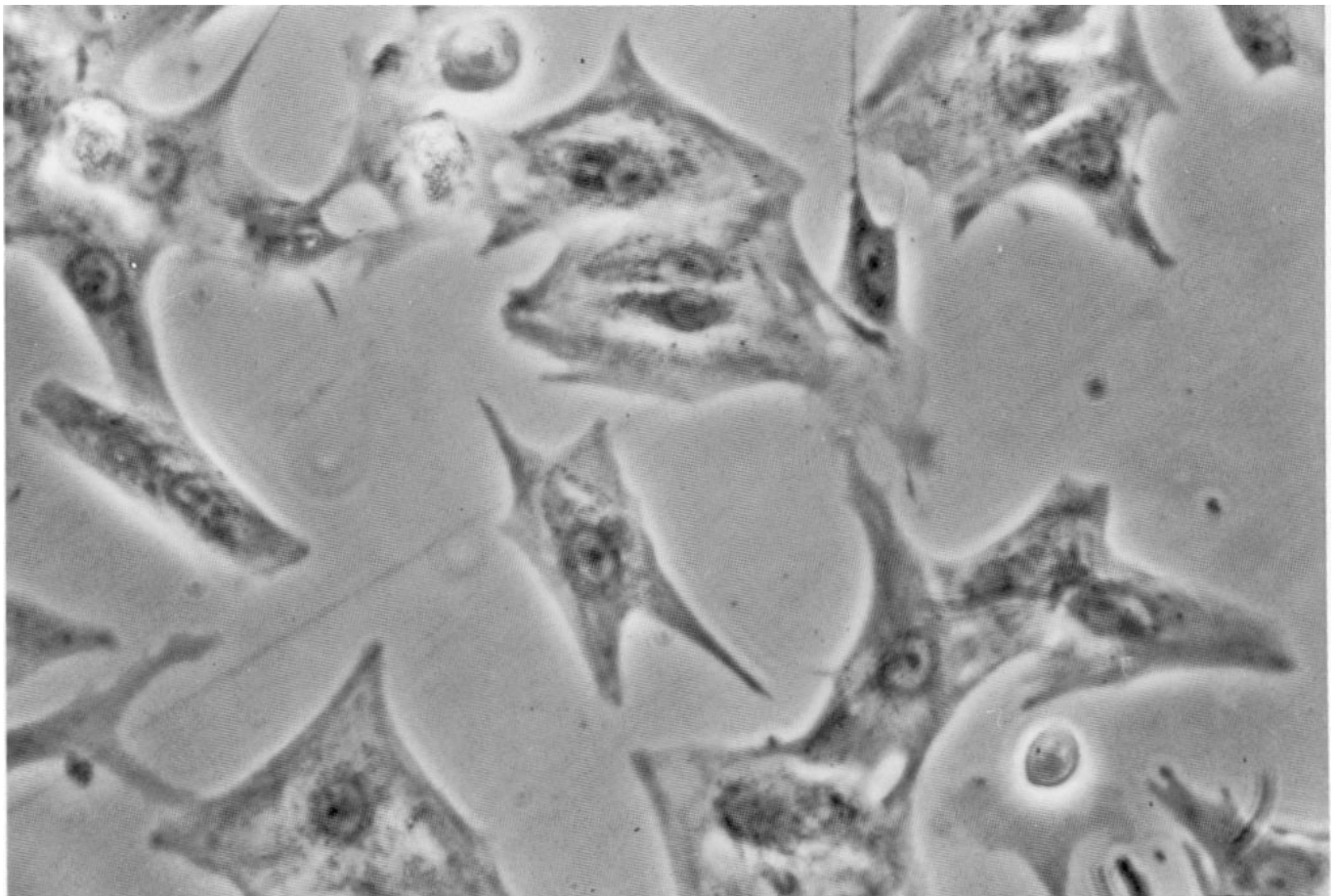


Abbildung 1: Herzmuskelzellen 48 Stunden nach Beginn der Kultivierung (600fache Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop). Aus: Werdan K, Reithmann C (1987).

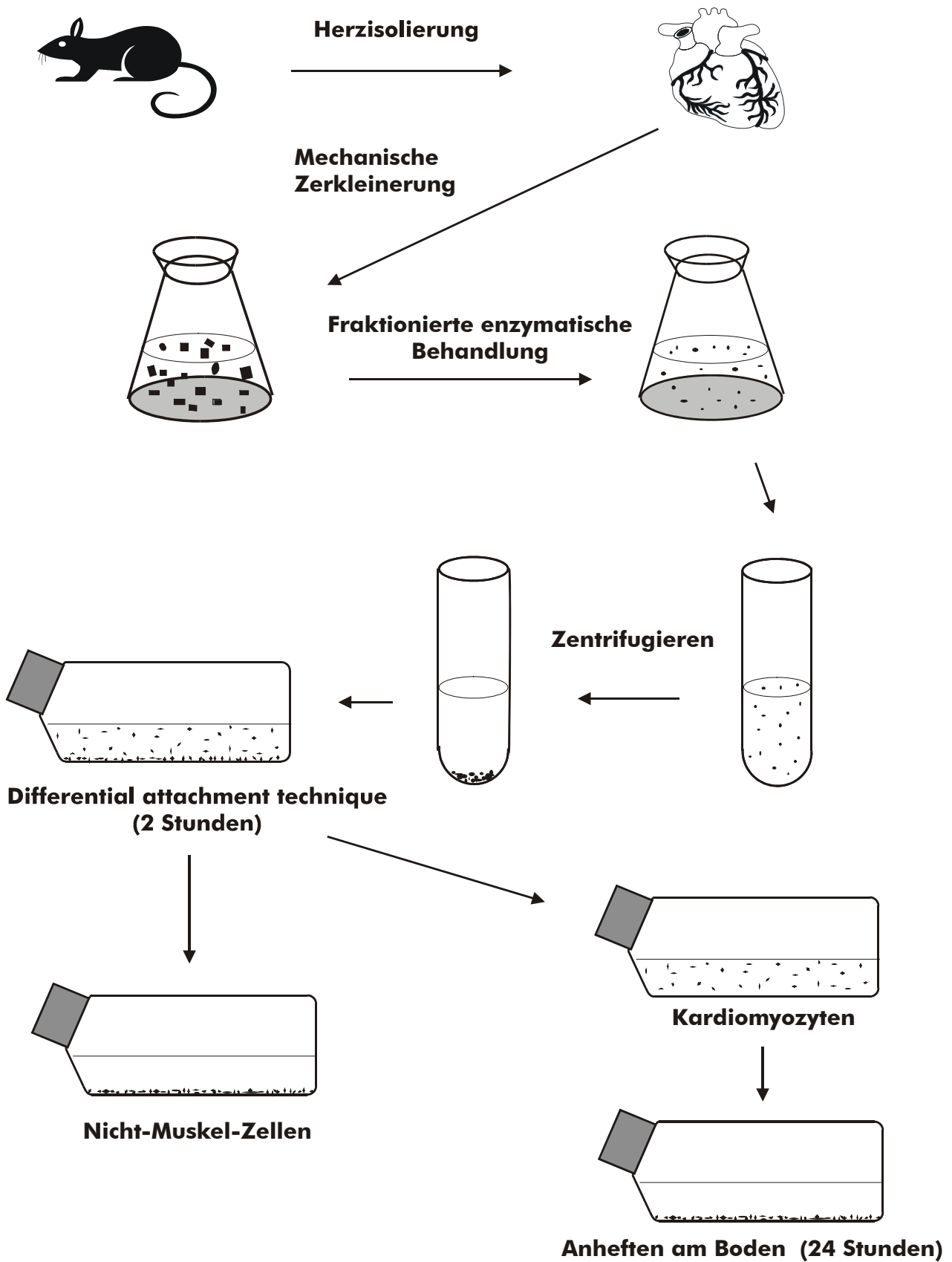


Abbildung 2: Die einzelnen Schritte bei der Präparation der neonatalen Rattenkardiomyozyten.

2.1.2. Kultivierung der Zellen

Im Verlauf der ersten 24 Stunden heften sich die Kardiomyozyten am Boden des jeweiligen Kulturgefäßes an. In dem serumhaltigen Züchtungsmedium können durch den Gehalt an Wachstumsfaktoren noch Reparaturvorgänge ablaufen. Nach dieser Zeitspanne wird serumhaltiges gegen serumfreies Medium (siehe 2.9.2.) ausgetauscht, in welchem sich die „Nicht-Muskelzellen“ nicht mehr teilen können. Da diese Zellen, die weniger als 10-20% der kultivierten Zellen ausmachen, in serumhaltigem Medium eine hohe Proliferationsrate besitzen, würden sie die Myozyten in kurzer Zeit überwuchern. Die Kardiomyozyten bilden einen spontan und synchron kontrahierenden Monolayer und können bei täglichem Mediumwechsel für mehrere Tage bis Wochen gezüchtet werden. Die Versuche werden für gewöhnlich am dritten Tag nach der Präparation durchgeführt, um standardisierte Bedingungen zu gewährleisten. Die Zellen zeigen zu diesem Zeitpunkt ein besonders gleichmäßiges spontanes Schlagverhalten. Durch den bis zu diesem Zeitpunkt erfolgten zweimaligen Mediumwechsel ist das serumhaltige Präparationsmedium bis auf minimale Reste ausgewaschen.

2.2. Gewinnung und Aufbereitung der Seren

2.2.1. Gewinnung von humanem Blut

Der Mensch ist zur Ratte diskordant. Als Beispiel eines xenogenen Systems wird humanes Blut, das PNAk gegen Rattenantigene enthält, zum Einsatz an der Ratten-HMZ-Kultur gewonnen. Für die Experimente wird Serum mit hohem Antikörpertiter gegen Rattenerythrozyten (siehe 2.3.1.) ausgewählt. Das Blutgewinnung erfolgt durch Punktion einer oberflächlichen Vene mittels Butterflykanüle.

2.2.2. Gewinnung von Blut mit induzierten Antikörpern

Zur Untersuchung der Wirkung von IAK dient das Serum spezifisch immunisierter Kaninchen. Als Immunisierungsmaterial dienen ein Rattenherzhomogenat oder Zellen aus einer Rattenherzzellkultur. Zur Herstellung des Herzhomogenats werden die Herzen von fünfzehn neonatalen Ratten eingesetzt. Die blutfreien Rattenherzen werden im Glaspotter unter Zugabe von PBSAG homogenisiert. Kulturzellen sind präparierte Kardiomyozyten (siehe 2.1.1.) von ungefähr fünfzehn Ratten aus einer Zellkulturflasche (600 ml; Nunclon Plastics, Dänemark). Wenige Stunden nach dem Wechsel von serumhaltigem auf serumfreies Medium werden die

Zellen nach dreimaligem Spülen mit je 20 ml Stopplösung (siehe 2.9.2.) vom Boden des Fläschchens abgekratzt und in 5 ml Stopplösung suspendiert.

Zur weiteren Verarbeitung werden sowohl die Kulturzellen als auch das Herzhomogenat in Zentrifugenröhrchen gefüllt und zehn Minuten bei ca. 3800 U/min zentrifugiert. Das nach zweimaligem Absaugen des Überstandes und jeweiliger Resuspension mit PBSAG gereinigte Sediment dient als Antigen. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgt mit ca. 1 ml der jeweiligen Lösung s.c. am lateralen Rumpf an den Tagen 1, 8 und 23. Unter Narkose mit einer 1:1-Mischung von Ketanest und Rompun (intramuskulär) werden die Tiere am 31. Tag durch Herzpunktion entblutet. Pro Kaninchen können etwa 100 ml Blut gewonnen werden.

2.2.3. Aufbereitung des Blutes

Sowohl Kaninchen- als auch Menschenblut werden sofort nach der Entnahme in Zentrifugenröhrchen (50 ml) gefüllt, die 10-15 Glaskügelchen enthalten, an denen das Fibrin und die zellulären Bestandteile koagulieren. Nach 45 min. bei +4°C wird das Serum durch mehrmaliges Zentrifugieren bei ca. 3000 U/min. vom Zellpellet abgetrennt und sofort weiterverarbeitet.

2.2.4. Gewinnung von Rattenerythrozyten

Ratten werden im Äthertopf betäubt. Unter Aufrechterhaltung der Narkose wird das Abdomen eröffnet und im Retroperitonealraum die Aorta freipräpariert. Das Blut wird über eine Kanüle mit einer Einmalspritze, die 500 I.E./ 10 ml Heparin enthält, aus der Aorta entnommen. Sodann werden bei 3800 U/min. die Erythrozyten abzentrifugiert und durch dreimaliges Resuspendieren mit PBSAG und erneutes Abzentrifugieren gewaschen.

2.2.5. Antikörperabsorption

Um den Einfluss der Antikörper selektiv nachzuweisen, werden Kontrollversuche mit species-spezifisch antikörperfreiem Serum durchgeführt. Hierzu ist es erforderlich, die gegen Ratten-epitope gerichteten präformierten Antikörper aus dem Serum zu entfernen.

Zur Absorption der PNAk wird ein Teil des Serums mit Rattenerythrozyten inkubiert. Rattenerythrozyten (Gewinnung siehe 2.2.4) werden in gleicher Menge dem Serum zugegeben. Die erste Absorption ist nach 30 min. Inkubation bei Raumtemperatur abgeschlossen. Während dieser Zeit werden die Röhrchen gelegentlich geschwenkt. Die mit Antikörpern beladenen Erythrozyten (Erythrozyten + PNAk) werden bei 3800 U/min. abzentrifugiert, und das im

Überstand befindliche Serum wird zur zweiten und erschöpfenden Inkubation auf frische Rattenerythrozyten pipettiert. Nach weiteren 30 min. und erneutem Zentrifugieren wird das spezifisch antikörperfreie Serum in Aliquots bis zur Verwendung eingefroren.

Zur Absorption von induzierten Antikörpern wird im wesentlichen gleich vorgegangen. Allerdings wird statt der Erythrozyten Rattenherz verwendet, das in einem Glaspotter homogenisiert wurde. Das Rattenherz entspricht dem, das zur Immunisierung eingesetzt wurde. So gelingt es, spezifisch die durch Immunisierung gebildeten Antikörper zu extrahieren.

2.2.6. Seruminaktivierung

Zur Dekomplementierung wird das Serum im Wasserbad für 30 min. auf 56°C erwärmt. Damit verlieren die hitzelablen Komplementfaktoren ihre Wirksamkeit. Falls das Serum nicht sofort verwendet wird, wird die Inaktivierung kurz vor dem Versuch noch einmal für 10 min. wiederholt.

2.2.7. Dialyse des Serums

Um bei der Inkubation der in SM kultivierten HMZ mit den Seren Differenzen des pH und der Elektrolyt- und Aminosäurekonzentrationen auf die Herzzellen zu vermeiden, werden die einzelnen Serumgruppen gegen das synthetische Medium (serumfrei!) dialysiert. Die Seren werden in Dialyseschläuche (Porengröße 10 kD, Reichelt Chemietechnik, Heidelberg) gefüllt und für mindestens 24 Stunden im Kühlraum in einen mit Parafilm verschlossenen Glaskolben gehängt, in dem sich SM befindet, das durch einen Magnetrührer in Bewegung gehalten wird.

2.3. Kontrolle der Serumqualität

2.3.1. Bestimmung des Hämagglutinationstiters

Mittels des direkten Hämagglutinationstests gegen Rattenerythrozyten lässt sich der Antikörpertiter des jeweiligen Serums gegen Rattenepitope ermitteln. Beim Hämagglutinationstest wird die Fähigkeit der Antikörper, Erythrozyten zu Aggregaten zu vernetzen, genutzt.

Nachdem die Komplementfaktoren der Seren durch Inkubation bei 56°C im Wasserbad inaktiviert worden sind, werden die Seren in einer Reihe von 1:2 bis 1:4096 verdünnt. Anschließend werden die Rattenerythrozyten (Gewinnung siehe 2.2.4.) hinzugefügt, es folgt eine 90-

minütige Inkubation bei 37°C. Danach werden die Proben für 30 min. bei 4°C gelagert. Der Hämagglutinationstiter entspricht derjenigen Serumkonzentration, bei der im Mikroskop gerade noch Aggregate von drei agglutinierten Erythrozyten nachweisbar sind.

2.3.2. Bikarbonat-Bestimmung

Die Bikarbonatkonzentration im Serum wird vor und nach der Dialyse ermittelt, um den Erfolg derselben zu überprüfen. Zur Messung dient das Blutgasanalysegerät Acid-Base Laboratory der Firma Radiometer Kopenhagen.

2.3.3. Bestimmung der Konzentrationen von Natrium, Kalium und Kalzium

Auch die Messung der Kalium-, Natrium- und Kalziumkonzentration dient der Kontrolle des Dialyseerfolges zur Vermeidung von Störeinflüssen auf die Zellen durch Elektrolytverschiebungen. Die Bestimmung der drei Kationenkonzentrationen wird mit einem Flammenphotometer der Firma Eppendorf (FCM 6341) vorgenommen. Jede Probe wird dreifach gemessen.

2.4. Bestimmung der Kontraktilitätsparameter

2.4.1. Aufbau der Messapparatur

Zur Beobachtung der schlagenden HMZ dient ein Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Axiovert 100) mit ca. 320-facher Vergrößerung, welches in eine Plexiglaskammer (Laborwerkstatt Großhadern) eingebaut ist. Um Einflüsse von Temperaturschwankungen auf die Zellen zu vermeiden, wird die Lufttemperatur (Soll 39°C) in dieser Kammer über einen Thermostaten gesteuert (Minco Temperature Controller CT137).

Das Bild der Kardiomyozyten wird durch eine an das Mikroskop angeschlossene Videokamera (Sony Video Camera Module XC-77CE) auf einem Schwarzweißmonitor (Grundig) dargestellt. Auf dem Monitor kann das Schlagen der Zellen online beobachtet werden. Die dunklen Zellkörper bilden mit dem helleren Hintergrund einen deutlichen Kontrast. Diesen nutzt man zur Aufzeichnung der Kontraktionen, indem man analoge Phototransistoren (Siemens BPY61), die am Monitor befestigt sind, so einstellt, dass sie auf einen Zellrand gerichtet sind. Die nun bei den Kontraktionen der Zelle an dieser Stelle auftretenden Schwankungen der Lichtintensität entsprechen den Kontraktionen der Zelle. Das Signal der Phototransistoren

kann nach Verstärkung und elektronischem Filtern mit einem Helligeschreiber graphisch dargestellt werden.

Mit Hilfe eines VHS-Recorders (Bauer Video Cassette Recorder VRP 30) kann das Bild der Kamera zusätzlich auf Videoband aufgenommen werden. Dadurch besteht die Möglichkeit, mit Hilfe dieser Aufzeichnung später noch weitere Zellen der Auswertung zuzuführen.

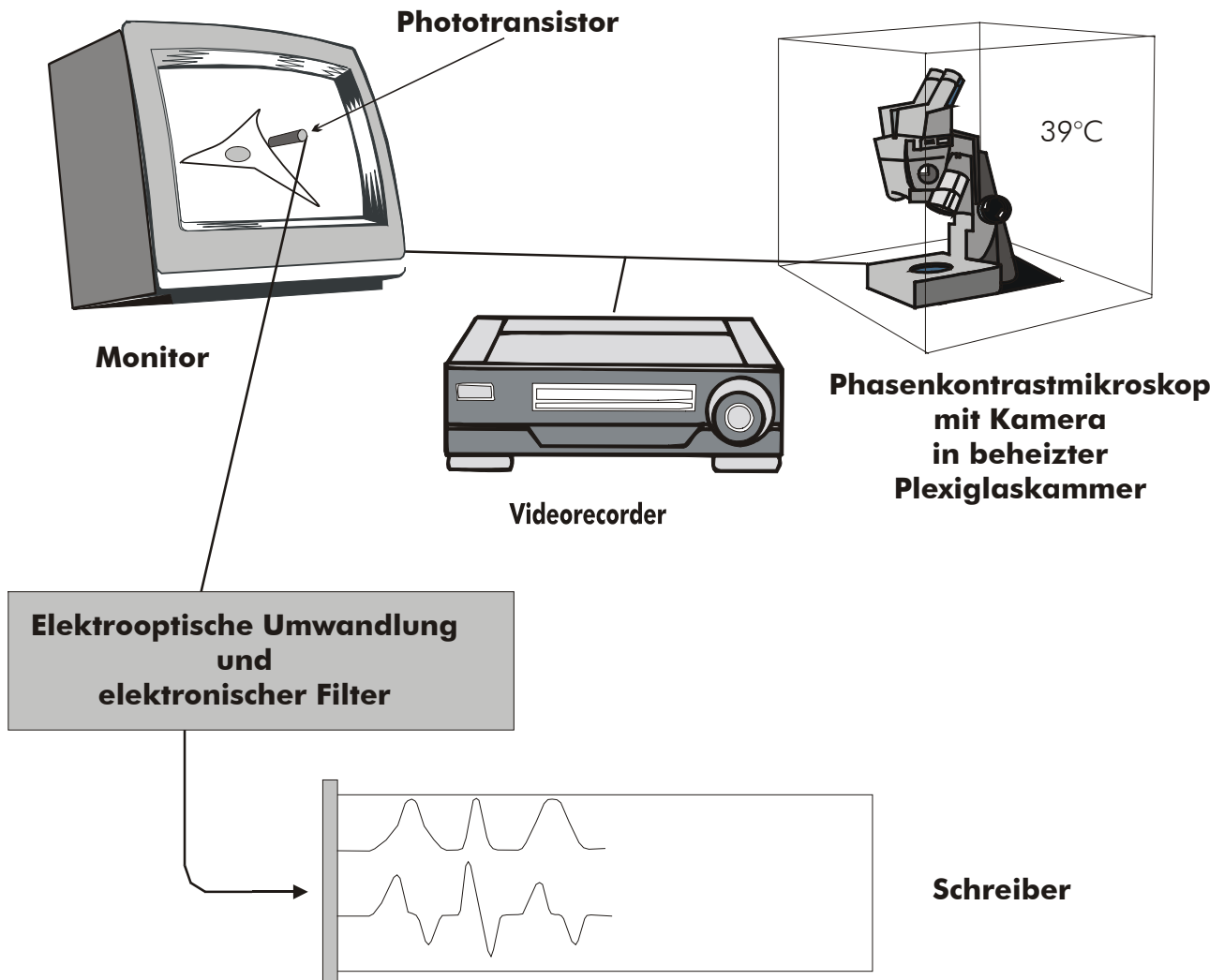


Abbildung 3: Aufbau der Messapparatur

2.4.2. Bestimmung der Kontraktionsparameter

Die Änderung der Lichtintensität am Zellrand kommt durch die zyklischen Kontraktionen und Relaxationen der jeweiligen Zelle zustande. Die graphische Darstellung der durch die Photodioden aufgenommenen Signale mit dem Helligeschreiber erlaubt bei bekannter Papiergeschwindigkeit eine Bestimmung der Frequenz bzw. der Kontraktionsdauer durch Ausmessen

der Abstände der einzelnen Kontraktionen. Durch Messen der Amplitudenhöhe der einzelnen Ausschläge lässt sich die relative Änderung der Kontraktionsamplituden erfassen.

Zusätzlich zur Änderung der Lichtintensität - dem Maß für die Pulsationsamplituden - wird mit dem Helligeschreiber die erste Ableitung der Pulsationsamplituden nach der Zeit aufgezeichnet. Die Peaks dieser zweiten Kurve entsprechen der maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit, welche ebenfalls in relativen Einheiten bestimmt werden.

Diese Parameter lassen Aussagen über die Frequenz (Chronotropie) zu, die direkt gemessen wird, aber auch über die Relaxations- („Lusitropie“) und Kontraktionsgeschwindigkeit („Inotropie“) der spontan schlagenden Kardiomyozyten. Als Ersatzparameter für die Kontraktions- bzw. Relaxationskraft gelten die maximale Kontraktions- bzw. Relaxationsgeschwindigkeit (Werdan & Erdmann 1989). Da mit dieser Auswertungsmethode nicht die Kraft direkt gemessen werden kann, sondern nur Parameter, die indirekt einen Rückschluss auf die Kontraktions- bzw. Relaxationskraft erlauben, werden die Begriffe „Inotropie“ und „Lusitropie“ in Anführungszeichen gesetzt.

Da bei den Versuchen spontan schlagende Herzmuskelzellen verwendet werden, ist die Kontraktionsfrequenz nicht konstant, sondern unterliegt Undulationen im Sinne einer Schlagfrequenzvariabilität. Die Frequenz beeinflusst jedoch auch die Pulsationsamplitude; je höher die Frequenz ist, desto niedriger ist die Amplitude und umgekehrt („negative stair case“). Folglich muss die Frequenz bei der Bestimmung von „Inotropie“ und „Lusitropie“ berücksichtigt werden.

Die Kontraktionsparameter im Rahmen der einzelnen Versuche werden erfasst, indem eine Minute vor Serumzugabe und während der ersten fünf Minuten danach alle 15 Sekunden je sechs Kontraktionen ausgewertet werden. Bei länger dauernden Beobachtungszeiträumen werden anschließend pro Minute sechs Kontraktionen analysiert. Aus den gewonnenen Daten werden Mittelwert und Standardabweichung berechnet und graphisch dargestellt. Die Standardabweichung lässt eine Aussage über die Regelmäßigkeit der Kontraktionen zu, analog dem klinisch angewandten Parameter der Herzfrequenzvariabilität.

Die bei der Auswertung erfassbaren fünf Parameter für das Schlagverhalten der Herzmuskelzellen sind demnach:

1. Frequenz (Chronotropie)
2. Pulsationsamplitude
3. „Inotropie“
4. „Lusitropie“
5. Regularität der Kontraktionen

Der Ablauf der Versuche gestaltet sich folgendermaßen:

Die Zellen (in 6er-Plates) werden unter das Phasenkontrastmikroskop gebracht, die Photoelektrode auf eine Zelle eingestellt und Videoband und Helligeschreiber gestartet. Nach einer Minute Beobachtung wird unter Sicht das synthetische Medium (SM) gegen neues SM ausgetauscht. Wenn die Zellen dies ohne wesentliche Änderung ihres Schlagverhaltens überstehen, wird nach weiteren zwei Minuten Beobachtung das SM gegen das jeweilige Versuchsmedium ausgetauscht. Nach einer halben Stunde wird der Versuch beendet. Alle Seren werden für die Versuche jeweils 1:2 mit SM verdünnt.

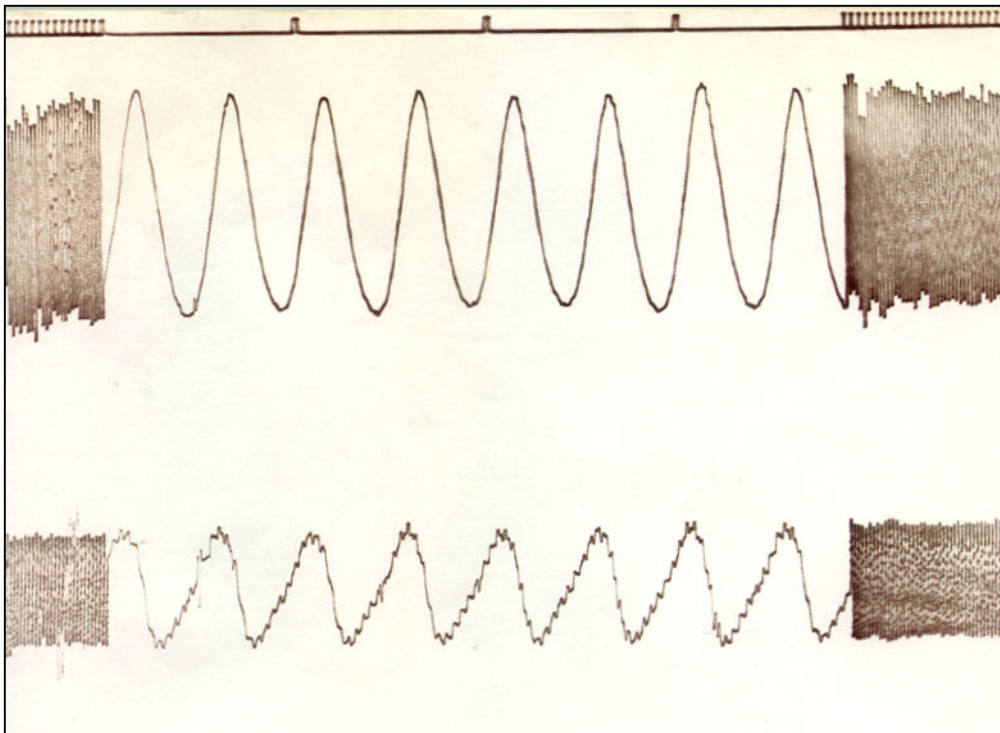


Abbildung 4: Bestimmung der Kontraktilitätsparameter durch Ausmessen der vom Hellige-Schreiber aufgezeichneten Kurven. Die oberste Linie dient der **Zeitskalierung**, jeder senkrechte Strich entspricht einer Sekunde. Die obere der beiden Kurven stellt die Änderung der Lichtintensität am Rand einer sich kontrahierenden Zelle dar. Aus den Abständen der einzelnen Kontraktionen lässt sich die Periodendauer und damit die **Frequenz** bestimmen. Die **Pulsationsamplitude** ergibt sich aus dem Abstand zwischen Maximum und Basislinie. Die untere Kurve ist die erste Ableitung der oberen Kurve nach der Zeit. Aus ihr lassen sich die maximale Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit ermitteln. Die **max. Kontraktionsgeschwindigkeit** ergibt sich aus dem Abstand zwischen Kurvenmaximum und Basislinie, die **max. Relaxationsgeschwindigkeit** aus dem Abstand zwischen Kurvenminimum und Basislinie.

2.4.3. Inkubation der Kardiomyozyten mit induzierten Antikörpern in verschiedenen Verdünnungen oder in verschiedenen Serumaufbereitungen

Bei der Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Wirkungen von induzierten Antikörpern oder der Wirkung verschieden aufbereiteter Seren wurde zur simultanen Erfassung von möglichst vielen Kulturgefäßen ein anderer Versuchsaufbau gewählt. Hierbei wurden die spontanen Kontraktionsfrequenzen mit Hilfe eines Handzählers über eine Dauer von zehn Sekunden pro Gesichtsfeld ausgezählt.

Für die Versuche, bei denen die Wirkung der induzierten Antikörper in verschiedenen Verdünnungen über 60 min. untersucht wird (siehe 3.2.2.), wird nach einem genau festgelegten

Zeitplan verfahren. Auf diese Weise werden etwaige Unterschiede durch verschiedenes Alter der Zellen und/oder unterschiedliche Inkubationsdauer ausgeschlossen. Pro Kulturloch wird je ein Gesichtsfeld ausgezählt, und zwar vor Zugabe der jeweiligen Serum-Medium-Mischung und dann 15, 30, 45 und 60 min. danach. Auch das Füttern der Zellen mit der jeweiligen Inkubationslösung sowie das „Abstoppen“ des Zellstoffwechsels erfolgt unter genauer Einhaltung des Zeitplans. Beim „Abstoppen“ wird der Zellstoffwechsel durch Zugabe von 4 ml eiskalter Stopplösung pro Kulturloch unterdrückt.

Der Einfluss von verschieden aufbereiteten Serumaliquots auf die Kontraktionsparameter über 2 h (siehe 3.2.3.) wird nach demselben Muster untersucht, allerdings erfolgt eine Frequenzbestimmung nur zu den Zeitpunkten $t = 0$ (vor Zugabe) und $t = 2$ h. Bei den eingesetzten Proben handelt es sich um ausschließlich dialysiertes Serum (K-RHS und K-RZK) und solches, das zusätzlich bearbeitet wurde; und zwar durch Absorption der Antikörper (K-RHSa) oder Inaktivierung des Komplementsystems (K-RHSi).

Zur Untersuchung des Frequenzverhaltens über 4 h (siehe 3.2.4.) wird im wesentlichen gleich vorgegangen. Eine Frequenzbestimmung erfolgt vor Zugabe der Serum-Medium-Mischung und an diese anschließend bis einschließlich des Zeitpunktes $t = 4$ h alle 60 min.. Pro Kulturloch und Zeitpunkt werden je drei Gesichtsfelder ausgezählt.

An einem Versuchstag, an dem vergleichsweise viele Zellen aufgrund der natürlichen Variabilität überhaupt nicht schlagen, werden die Zellen durch Elektroden stimuliert. Diese werden in das Inkubationsmedium in den Kulturlöchern gehängt. Es werden im Labor für andere Versuche vorhandene Elektroden verwendet, die an einem sogenannten Perfusions-Stimulationsadapter befestigt sind. Diese werden an einen Grass SD Stimulator angeschlossen (100 V, Pulsdauer 5 msec, Stimulationsfrequenz 100/min). Die Zellen werden für wenige Sekunden stimuliert, dann werden die Stimulationselektroden wieder entfernt.

Bei der Inkubation über 24 h (siehe 3.2.5.) wird die Frequenz vor Zugabe und zum Zeitpunkt $t = 24$ h in je drei Gesichtsfeldern pro Kulturloch bestimmt.

2.5. Zytotoxizitätsparameter

2.5.1. Proteinbestimmung nach Lowry

Nach Ende der Inkubationszeit mit dem jeweiligen Serum werden die Zellen zweimal mit 0°C kalter Stopplösung (siehe 2.9.2.) gespült, um den Stoffwechsel der Zellen zu fixieren. Außerdem werden auf diese Weise Serumreste und abgelöste Zellen entfernt. Dann wird 1 ml 0,2 M NaOH auf die Zellen pipettiert, unabhängig davon, ob die Zellen sich in Fläschchen oder in 6er-Platten befinden. Die Zellen werden dann für 24-48 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit löst die Natronlauge die Zellen komplett auf. Anschließend wird die Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry, 1951) durchgeführt. Die Standardkurve wurde mit Rinder-Serumalbumin erstellt.

2.5.2. Kaliummessung

Einen sehr sensitiven Parameter zur Bestimmung der Zytotoxizität stellt die Messung des am Ende der Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern noch in den Zellen vorhandenen Kaliums dar. Das in der NaOH (Detergens) zur Proteinbestimmung nach Lowry enthaltene Kalium entspricht der Menge Kalium, die am Versuchsende noch intrazellulär enthalten war. Hieraus lassen sich Rückschlüsse auf die Unversehrtheit der Zellmembran und des Energiestoffwechsels ziehen. Das Kalium wird mit Hilfe eines Eppendorf-Flammenphotometers gemessen. Zu diesem Zweck werden eine Nulllösung (1:10 mit Aqua bidest. verdünntes Detergens) und eine Kalium-Standardlösung (Nulllösung mit einer 37,5 µM KCl-Konzentration) hergestellt. Die Eichung des Flammenphotometers erfolgt, indem nach Abgleichung des Nullwertes auf der Kaliumskala des Photometers der Messwert für die Standardlösung mit 7,5 Einheiten gleichgesetzt wird. Die Kaliumkonzentration in den Proben (die vor der Messung ebenfalls 1:10 verdünnt werden) ergibt sich aus der Formel

$$K^+ = \frac{37,5 * \text{Meßwert}}{7,5} [\mu M].$$

Als Maß der Zelldichte in dem jeweiligen Kulturgefäß werden die Messergebnisse auf die jeweilige Proteinkonzentration bezogen, so dass man am Ende Kalium [nmol] pro Protein [mg] erhält.

2.5.3. Messung von energiereichen Phosphaten mit der HPLC

Als Ausgangsmaterial dienen die Zellen von zwei 6er-Platten, von denen eine mit IAK-haltigem Serum (K-RHS) in einer 1:2-Verdünnung mit SM, die andere als Kontrollgruppe mit SM befüttert wird; pro Well werden jeweils 2 ml der entsprechenden Lösung eingesetzt. Die Zellen werden anschließend für zwei Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Um die Auswirkungen der induzierten Antikörper auf die Produktion von energiereichen Phosphaten in den Kardiomyozyten untersuchen zu können, wird nach der Inkubation eine ATP-Extraktion durchgeführt. Hierzu werden nach dem Absaugen der jeweiligen Medien am Ende der Inkubationszeit alle Wells dreimal mit je 2 ml 0°C-kalter Stopplösung gespült. Dann werden die Zellen jedes Kulturlochs sorgfältig mit je 400µl 8%iger Perchlorsäure (PCA) benetzt. Die Platten werden für zehn Minuten auf Eis gestellt und während dieser Zeit dreimal geschwenkt. Nachdem aus jedem Well 350 µl in je ein Eppendorf-Cup pipettiert wurden, wird die restliche PCA sorgfältig abgesaugt und pro Well 1 ml 0,2 M NaOH zur Proteinbestimmung nach Lowry (siehe 2.5.1.) hinzugefügt. Der pH der PCA-Lösung in den Cups wird mit 1,25 M und 0°C kalter K₂CO₃ auf einen Sollwert von pH 6-7 neutralisiert, was mittels pH-Papier überprüft wird. Die Proben werden bei -20°C vorgefroren und anschließend bei -40°C aufbewahrt.

Die Analyse des ATP-, CP- und GTP-Gehaltes der Proben erfolgt mittels „reverse phase“ Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Das HPLC-System besteht aus einer Pumpe (LKB 2150 HPLC Pump), einem Detektor (LKB 2151 Variable Wavelength Monitor), einer C14-Säule (Fa. Shandon) und einem Schreiber (LKB 2210 Recorder 1-Channel). Als mobile Phase dient Ammoniumdihydrogenphosphat (75 mM, pH 5,75) mit einer Flussrate von 1,5 ml/min. Die Apparatur wird zuerst mit entgastem Methanol, dann mit entgastem und HPLC-reinem Aqua bidest. und schließlich mit entgastem Puffer gespült. Zuerst werden die Standards injiziert und dann die Proben. Die Proben werden nach dem Auftauen für zwei Minuten zentrifugiert. Für die Messung wird der Überstand aus den Cups abgenommen, ohne das Pellet aufzuwirbeln.

2.5.4. Trypanblaufärbung

Eine sehr gebräuchliche, aber wenig sensitive Methode zur Untersuchung der Zytotoxizität stellt die Trypanblauausschlussmethode dar. Lebende Zellen sind fähig, Trypanblau aus dem Zytoplasma aktiv auszuschleusen. Wenn die Zellmembran nicht mehr intakt ist, färben sich

die Zellen an, so dass überlebende und tote Zellen färbetechnisch unterschieden werden können.

Die Zellen, die sich in drei 6er-Platten befinden, werden mit drei unterschiedlichen Medien bestückt. Eine Platte wird mit humanem Serum (XS), die zweite mit IAK-haltigem Serum (K-RHS) und die dritte als Kontrolle mit SM befüllt. Pro Kulturloch werden 2 ml eingesetzt, wobei die Seren vorher jeweils 1:2 mit SM verdünnt werden. Die Zellen werden für zwei Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach werden das Medium bzw. die Serum-Medium-Mischung abgesaugt. Die Zellen werden dreimal mit PBSAG abgespült, um Serumreste zu entfernen, welche die Trypanblaufärbung stören könnten, da Trypanblau eine höhere Affinität zu Serum- als zu Zellproteinen hat (Geschickter, 1936). Die letzte PBSAG-Lösung wird abgesaugt und 1:10 mit PBSAG-Lösung verdünntes Trypanblau auf die Zellen gegeben. Nach einigen Minuten werden die Zellen unter dem Lichtmikroskop bei einer 12x10-fachen Vergrößerung betrachtet, und das Ergebnis wird photographisch festgehalten.

2.5.5. Elektronenmikroskopische Untersuchung

Die Elektronenmikroskopie erlaubt eine präzise ultrastrukturelle Beurteilung als Anhalt für die Zellvitalität. Für diese Untersuchung werden die Zellen in Zellkulturfläschchen wie bei der Trypanblaufärbung drei Gruppen (SM, XS und IAK) zugeordnet und für zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wird das Medium aus den Fläschchen abgesaugt, und die Zellen werden für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 6,25%iger Glutaraldehyd-Lösung in Sörensen-Phosphat-Puffer fixiert. Nach Absaugen des Glutaraldehyds werden die Zellen dreimal mit 1-2 ml Saccharosepuffer pro Fläschchen gespült. Es werden pro Fläschchen nun 5 ml Saccharosepuffer zugegeben; so können die Fläschchen bis zur Untersuchung im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. Müller-Höcker vom Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München.

2.6. Einfluss von PNAk auf Kardiomyozyten bei Inkubation bis zu 24 Stunden

2.6.1. Frequenzbestimmung

Es werden Zellen in Sechs-Loch-Platten verwendet. Zur Bestimmung der Frequenz werden vor Zugabe der jeweiligen Serum-Medium-Mischung bzw. von SM (Kontrolle) und alle zwei Stunden danach die Frequenzen von fünf Gesichtsfeldern pro Well ausgezählt. Zum exakten Zählen wird ein Handzähler verwendet; eine Aufzeichnung und Auswertung der Kontraktionen, wie in 2.4.2. beschrieben, ist bei diesen Versuchen nicht möglich, da dies den eng gestaffelten Zeitplan des Versuchsprotokolls, das eine simultane Frequenzmessung in vielen Platten vorsieht, sprengen würde. Die Fütterung erfolgt nach Zählung der Ausgangsfrequenzen für die jeweilige Platte. Die zeitliche Staffelung der Messzeitpunkte wird so vorgenommen, dass die Inkubationsperioden für jedes Gefäß gleich lang sind.

2.7. Auswirkungen der PNAk auf den Stickoxid-Stoffwechsel

2.7.1. Versuchsaufbau

Stickoxid (NO) spielt als Mediators substanz ubiquitär, vor allem auch am Herzen, eine wichtige Rolle. Um zu untersuchen, welchen Einfluss xenogenes Serum auf die NO-Produktion der Herzmuskelzellen hat, werden Versuche zur deren Abhängigkeit sowohl von der Inkubationszeit als auch von der Serumkonzentration unternommen. Mit der jeweiligen Serum-Medium-Mischung werden zum einen die Zellen befüttert, zum anderen wird je 1 ml in leere Fläschchen gefüllt und für die gleiche Zeit im Brutschrank aufbewahrt wie die Zellen. Diese Serum-Medium-Mischung dient als Nullwert bei der Bestimmung der NO-Produktion durch die Zellen. Am Ende des Versuches werden aus der Versuchs- und der Kontrollgruppe je zweimal 0,5 ml abgenommen und bei -20°C eingefroren. Sodann wird nach zweimaligem Spülen mit je 5 ml eiskalter Stopplösung 1 ml 0,2M NaOH auf die Zellen pipettiert und diese für die Proteinbestimmung nach Lowry (siehe oben) weiterbehandelt. Dadurch, dass die NO-Produktion auf die Proteinmenge pro Fläschchen bezogen wird, sind die Aussagen unabhängig von verschiedenen Zelldichten miteinander vergleichbar.

2.7.2. Nitritmessung

Die Messung des Nitrits als einem Endprodukt des NO-Stoffwechsels im Kulturüberstand erfolgte dankenswerterweise durch Herrn Dr. Stadler vom Klinikum Rechts der Isar, München. Auf photometrischem Wege wird das Nitrit mittels der Griess-Reaktion bestimmt, bei der sich die Lösung bei Anwesenheit von Nitrit nach Zusatz von Nitritreagens rot färbt. NO reagiert unter Bedingungen der Zellkultur in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 in Nitrit und Nitrat weiter; der Nitritgehalt kann somit als Maß der NO-Produktion gelten.

2.8. Einfluss von Immunglobulinlösungen auf die Herzmuskelzellen

Um zu zeigen, dass die Veränderungen, die an den Herzmuskelzellkulturen festgestellt werden, nicht durch speziesspezifische Antikörper verursacht sind, werden die Zellen mit kommerziell erhältlichen Immunglobulinlösungen inkubiert, die einen unterschiedlich hohen Gehalt an xenoreaktiven Antikörpern aufweisen. Diese wurden vor dem Versuch genau wie die Seren dialysiert (siehe 2.2.7.). Als IgG-Lösung wurde Intraglobin F (Fa. Biotest, Dreieich; 50 mg Protein, davon Immunglobulin mindestens 95%) und als IgM-reiche Lösung Pentaglobin (Firma Biotest) eingesetzt. Der Ablauf und die Auswertung der Versuche erfolgten wie in 2.4.2. beschrieben.

2.9. Materialien und Inkubationslösungen

2.9.1. Verwendete Materialien

CMRL 1415 ATM - Fa. Biochrom, Berlin

Collagenase „Worthington“ - Fa. Biochrom, Berlin

Dexamethason (Nr.: D 8893) - Fa. Sigma Chemie, Taufkirchen

Eisengesättigtes Transferrin - Fa. Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, Mannheim

Fetales Kälberserum - Fa. Biochrom, Berlin

Gernebcin 80 (Tobramycinsulfat) - Fa. Lilly Deutschland, Gießen

Hepes (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethanolsulfonsäure) - Fa. Serva Biochemica

Intraglobin F - Fa. Biotest, Deutschland

Pentaglobin - Fa. Biotest, Deutschland

Pferdeserum - Fa. Biochrom, Berlin

Rinderserumalbumin (Nr.: 11920) - Fa. Serva Biochemica, Heidelberg

Rinderinsulin (Nr.: I 15500) - Fa. Sigma Chemie, Taufkirchen

Trypsin 1:250 (Nr.: 37290) - Fa. Serva Biochemica, Heidelberg

Alle übrigen Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und können über die Firmen Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, Merck und Sigma bezogen werden.

2.9.2. Verwendete Inkubationslösungen

Serumfreies Züchtungsmedium:

(= Synthetisches Medium, SM)

2,35 g/l CMRL 1415 ATM Medium	7,5 mM D-Glucose
135 mM NaCl	10 mM Hepes
5,4 mM KCl	25 mg/l Rinderalbumin
0,36 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	25 µg/ml Rinderinsulin
1,3 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 µM Dexamethason
0,97 mM MgSO ₄ x H ₂ O	0,25 µg/ml eisengesättigtes Transferrin
1,4 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	0,02 mg/ml Gernebcin 80
pH-Wert-Einstellung mit 10 M NaOH auf pH 7,4	

Serumhaltiges Züchtungsmedium:

2,35 g/l CMRL 1415 ATM Medium	7,5 mM D-Glucose
135 mM NaCl	10 mM Hepes
5,4 mM KCl	10% Fetales Kälberserum
0,36 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	10% Pferdeserum
1,3 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,02 mg/ml Gernebcin 80
0,97 mM MgSO ₄ x H ₂ O	pH-Wert-Einstellung mit 10 M NaOH auf
1,4 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	pH 7,4

PBSAG:

(phosphate buffered saline A/glucose, kalzium- und magnesiumfrei)

137 mM NaCl	10,6 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
2,7 mM KCl	2,1 mM KH ₂ PO ₄

5 mM D-Glucose

pH-Wert-Einstellung auf pH 7,4

Stopplösung:

1,8 mM CaCl₂ x H₂O

10 mM Hepes

280 mM Sorbit

pH-Wert-Einstellung mit 10 M NaOH auf
pH 7,4

Pufferlösung für die HPLC:

8,62 g/l (NH₄)H₂PO₄

H₂O bidest. (HPLC-rein)

pH-Wert-Einstellung auf pH=5,75 mit 3 M NH₄OH

Sodann den Puffer steril filtrieren und mit der Vakuumpumpe entgasen.

2.10. Statistische Methoden

Neben häufig verwandten Testverfahren wie z.B. t-Test, χ^2 -Test oder Kruskal-Wallis-Test werden in der vorliegenden Arbeit auch seltenere statistische Verfahren eingesetzt. Hierbei bin ich Herrn Prof. Dr. Schreiber vom Institut für Epidemiologie der LMU München für seine Beratung zu großem Dank verpflichtet. Dies sollen im folgenden kurz dargestellt werden:

2.10.1. Multiple Vergleiche nach Scheffé

Zum Vergleich der Proteinmenge in den bis zu fünf Gruppen werden die multiplen Vergleiche nach Scheffé zur Untersuchung der Unterschiede am Ende der Inkubation eingesetzt. Es wird eine kritische Differenz nach der folgenden Formel (nach Sachs 1992) berechnet:

$$D = \sqrt{s_{in}^2 (1/n_i + 1/n_j)(k-1)F_{(k-1; v_{s^2_{in}}; \alpha)}}$$

Dabei stellt s_{in}^2 das mittlere Quadrat des Versuchsfehlers dar, sowie n_i und n_j die Stichprobenumfänge der verglichenen Mittelwerte. Mit $v_{s^2_{in}}$ wird die Anzahl der Freiheitsgrade für das mittlere Quadrat des Versuchsfehlers bezeichnet.

2.10.2. Varianzanalyse nach Hartley

Unter der Voraussetzung gleich großer Stichprobengruppen wird die Nullhypothese auf Gleichheit der Varianzen ($\sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \dots = \sigma^2_i = \dots = \sigma^2_k = \sigma^2$) mit Hilfe folgender Formel getestet (nach Sachs 1992):

$$\hat{F}_{\max} = \frac{\text{größte Stichproben-Varianz}}{\text{kleinste Stichproben-Varianz}} = \frac{s^2_{\max}}{s^2_{\min}}$$

Wenn das Ergebnis dieser Formel einen aus der Tabelle zu entnehmenden Wert überschreitet, wird die Homogenitätshypothese auf dem 1%-Niveau abgelehnt und dann die Alternativhypothese ungleicher Varianzen ($\sigma^2_i \neq \sigma^2$) für bestimmte Gruppen akzeptiert. Die Grenzwerte sind:

- für 20 Stichproben 3,32,
- für 30 Stichproben 2,63,
- für 60 Stichproben 1,96
- und für mehr als 60 Stichproben 1,00.

Die Varianz der Frequenzen ergibt sich aus der Formel:

$$s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}.$$

2.10.3. U-Test nach Mann-Whitney

Der Mann-Whitney-Test ist ein Rangzahlen-Test. Die zu testenden Werte werden der Größe nach geordnet, in dieser Arbeit wird mit den Standardabweichungen für die Frequenzen der fünf Gesichtsfelder pro Well so verfahren (siehe 3.4.2.). Jeder Standardabweichung wird eine Rangzahl zugeordnet. Sodann werden die U-Werte für die beiden Gruppen (Kontrolle und XS) nach folgenden Formeln berechnet:

$$U_{Ko} = n_{Ko} * n_{Xs} + \frac{n_{Ko} * (n_{Ko} + 1)}{2} - R_{Ko}$$

$$U_{Xs} = n_{Ko} * n_{Xs} + \frac{n_{Xs} * (n_{Xs} + 1)}{2} - R_{Xs}.$$

Hierbei ist n die Größe der jeweiligen Gruppe und R die Summe der Rangzahlen. Die kritischen Werte U_{krit} werden einer Tabelle entnommen. Wenn einer der Werte U kleiner oder

gleich ist wie der kritische Wert, wird die Nullhypothese H_0 (die Standardabweichungen der beiden Gruppen sind gleich groß) abgelehnt.

2.10.4. Der Variationskoeffizient

Der Vorteil der Verwendung von Variationskoeffizienten besteht in einer besseren Vergleichbarkeit der Streuung zweier Merkmale auch bei unterschiedlichen Mittelwerten, und zwar durch Berechnung der relativen Streuung. Der Variationskoeffizient drückt den Streuwert in Prozenten des arithmetischen Mittels aus, wobei V den Variationskoeffizienten, σ die Streuung und μ das arithmetische Mittel darstellen:

$$V = \frac{\sigma}{\mu} * 100 .$$

2.10.5. Prüfung der Gleichheit mehrerer Varianzen nach Cochran

Die Gleichheit mehrerer Varianzen kann auch nach Cochran bestimmt werden (Anwendung siehe 3.4.4.). Wenn die Stichprobenumfänge nicht gleich sind, wird dazu ihr harmonisches Mittel \bar{x}_H berechnet:

$$\bar{x}_H = \frac{n}{\frac{1}{x_1} + \frac{1}{x_2} + \dots + \frac{1}{x_n}} .$$

Hierbei ist n die Anzahl der Werte, aus denen der Mittelwert gebildet werden soll, und x steht für die jeweiligen Werte. Das harmonische Mittel dient zur Bestimmung der Freiheitsgrade $\nu = \bar{x}_H - 1$. Mit Hilfe von ν und k (Anzahl der Gruppen) kann aus der Tabelle die Signifikanzschranke ermittelt werden. Die Prüfgröße ergibt sich aus folgender Formel:

$$\hat{G}_{\max} = \frac{s_{\max}^2}{s_1^2 + s_2^2 + \dots + s_k^2} .$$

2.10.6. Multiple Vergleiche nach Nemenyi

Falls sich im Kruskal-Wallis-Test ein signifikanter Unterschied mehrerer Gruppen ergeben hat, kann man mittels der multiplen Vergleiche nach Nemenyi feststellen, welche der verschiedenen Gruppen sich voneinander unterscheiden. Hierzu werden die Werte der Größe nach geordnet und Rangzahlen vergeben. Aus diesen wird für jede Gruppe eine Rangsumme

gebildet. Deren absolute Differenzen werden gegen das aus einer Tabelle zu entnehmende Quantil geprüft.

3. Ergebnisse

3.1. Kontrolle der Serumqualität

3.1.1. Serumparameter vor der Dialyse

Eine Qualitätskontrolle durch Ermittlung wesentlicher Serumparameter vor und nach Dialyse ist aus drei Gründen erforderlich. Zum einen lässt sich überprüfen, ob die Dialyse hinsichtlich des Ausgleichs der für die Kontraktion wichtigen Ionen erfolgreich war. Zum anderen lässt sich anhand der Hämagglutinationstiter feststellen, ob sich Löcher in der Dialysemembran befanden, die dessen Abfallen zur Folge hätten; es würde ein Ausgleich der Antikörperkonzentrationen zwischen Serum und Dialysemedium erfolgen, der bei intakter Membran nicht möglich wäre. Auch eine Verdünnung des Serums durch onkotische Effekte könnte einen derartigen Abfall des Hämagglutinationstiters bewirken. Schließlich fiel eine Schwankung des Antikörpertiters zwischen zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommenen Aliquots des humanen Serums (SHH) auf, welches immer von der gleichen Person stammte. Allerdings war dies aufgrund früherer Untersuchungen (Klein, 1994) nicht zu erwarten. Analoge Qualitätskontrollen wurden für alle weiteren eingesetzten antikörperhaltigen Lösungen durchgeführt (K-RZK, K-RHS, Pentaglobin und Intraglobin F).

Die Bestimmung der Serumparameter vor der Dialyse erbrachte folgende Ergebnisse (alle Elektrolytkonzentrationen in mmol/l):

Serum	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	HCO ₃ ⁻	Hämaggltit.
SHH 1	138,2 ± 1,4	4,01 ± 0,03	2,38 ± 0,06	23,2	1:256
SHH 2	140,5 ± 0,4	4,48 ± 0,05	2,42 ± 0,04	26	1:256
SHH 3	142,3 ± 0,8	4,36 ± 0,05	2,31 ± 0,07	25,5	1:256
SHH 4	142,5 ± 1,7	4,39 ± 0,06	2,38 ± 0,09	22,8	1:256
SHH 5	139,1 ± 1,5	4,27 ± 0,04	2,35 ± 0,02	23,7	1:512
SHH 6	145,6 ± 1,2	4,42 ± 0,05	2,46 ± 0,05	24,6	1:512
SHH 7	146,3 ± 0,6	4,25 ± 0,06	2,28 ± 0,06	25,8	1:256
SHH 8	140,1 ± 1,1	4,38 ± 0,02	2,40 ± 0,04	24,1	1:256
SHH 9	143,2 ± 0,9	4,45 ± 0,05	2,40 ± 0,10	25,9	1:128
K-RHS	132,7 ± 0,6	4,38 ± 0,02	3,1 ± 0,08		1:32 bis 1:64
K-RZK	133,7 ± 0,5	4,72 ± 0,03	2,8 ± 0,05		1:32 bis 1:64
Intraglobin F		nicht bestimmt			1:8
Pentaglobin		nicht bestimmt			1:512

Tabelle 1: Serumparameter vor der Dialyse (SHH: humanes Serum, K-RHS bzw. K-RZK: Serum eines mit Rattenherzsediment bzw. HMZ aus Zellkultur immunisierten Kaninchens).

3.1.2. Serumparameter nach der Dialyse

Nach erfolgter Dialyse werden die gleichen Werte noch einmal bestimmt. Dadurch ist eine Aussage über die Effekte der Dialyse bezüglich Ionenkonzentration und Hämagglutinationstiter möglich. Zusätzlich werden noch die Messwerte für diejenigen Seren angegeben, die weiterverarbeitet (inaktiviert, absorbiert oder beides) wurden. Dabei ergeben sich folgende Serumparameter (Elektrolytkonzentrationen in mmol/l):

Serum	Na⁺	K⁺	Ca²⁺	HCO₃⁻	Hämagglit.
SHH 1	135,5 ± 2,0	5,45 ± 0,18	1,33 ± 0,11	1,3	1:512
SHH 2	137,1 ± 1,8	5,38 ± 0,11	1,41 ± 0,05	1,5	1:256
SHH 3	136,8 ± 2,1	5,32 ± 0,14	1,32 ± 0,08	0,8	1:256
SHH 3 ina.,abs.	140,2 ± 1,9	5,39 ± 0,17	1,36 ± 0,10	0,7	0
SHH 4	136,2 ± 1,2	5,40 ± 0,21	1,35 ± 0,08	0,9	1:256
SHH 5	136,9 ± 1,6	5,36 ± 0,09	1,28 ± 0,04	1,7	1:512
SHH 4+5 ina.	138,2 ± 0,9	5,42 ± 0,14	1,32 ± 0,07	1,8	1:256
SHH 4+5 abs.	137,5 ± 1,6	5,37 ± 0,13	1,26 ± 0,12	1,7	0
SHH 4+5 in.,ab	138,9 ± 1,3	5,34 ± 0,16	1,33 ± 0,05	1,6	0
SHH 6	135,8 ± 2,6	5,42 ± 0,13	1,27 ± 0,03	0,9	1:512
SHH 7	138,2 ± 1,5	5,47 ± 0,11	1,36 ± 0,07	0,5	1:256
SHH 8	138,3 ± 0,7	5,33 ± 0,14	1,30 ± 0,05	0,6	1:256
SHH 8 ina.,abs.	137,2 ± 1,2	5,41 ± 0,12	1,28 ± 0,09	0,8	0
SHH 9	137,4 ± 2,2	5,35 ± 0,05	1,34 ± 0,02	1,1	1:128
K-RHS	136,8 ± 1,4	5,35 ± 0,14	1,28 ± 0,04	1,1	1:32 bis 1:64
K-RHS ina.	137,2 ± 1,2	5,37 ± 0,09	1,29 ± 0,06	1,2	1:64
K-RZK	138,1 ± 0,6	5,42 ± 0,11	1,31 ± 0,08	0,8	1:32 bis 1:64
Intraglobin F	139,0 ± 0,7	5,48 ± 0,13	1,30 ± 0,09		1:8
Pentaglobin	136,4 ± 1,5	5,39 ± 0,09	1,29 ± 0,10		1:256
Referenz (SM)	136,8	5,4	1,3	0	0

Tabelle 2: Serumparameter nach der Dialyse (Abkürzungen siehe Tabelle 1)

Zusammenfassend lässt sich also feststellen:

1. Die Ionenkonzentrationen im Serum werden durch die Dialyse weitgehend denjenigen im SM angeglichen. Einflüsse auf die Kontraktilität der HMZ durch Unterschiede in den Ionenkonzentrationen werden also ausgeschlossen.
2. Die Antikörperkonzentration in den Seren, ausgedrückt durch den Hämagglutinationstiter, wird durch die Dialyse nicht verändert.
3. Der Hämagglutinationstiter wird durch die Hitzeinaktivierung des Komplementsystems nicht verändert.
4. Die Absorption der Seren führt zu einer kompletten Elimination der gegen Rattenepitope gerichteten Antikörper. Der Hämagglutinationstiter ist Null.

3.2. Einfluss der induzierten Antikörper

3.2.1. Kontraktilitätsparameter bei Inkubation bis 30 min.

3.2.1.1. Kontrollversuch

Es muss ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte auf mechanische Beeinflussung beim Wechsel des Kulturmediums zurückgehen. Deshalb wird vor jedem Versuch ein Mediumwechsel vorgenommen, der unter den gleichen Bedingungen stattfindet wie der Wechsel von SM auf das jeweilige Versuchsserum in den folgenden Versuchen.

Durch diesen Mediumwechsel soll keine Störung der Kontraktionen (z.B. arrhythmisches Schlagen, Stillstand o.ä.) hervorgerufen werden. Derartige Störungen führen im Falle ihres Auftretens zum Ausschluss der jeweiligen Zellen aus den weiteren Versuchen.

Außerdem wird durch die Beobachtung und Auswertung einer Kontrollgruppe über die gesamte Versuchsdauer eine Vergleichbarkeit der durch die Antikörper hervorgerufenen Effekte mit dem Normalzustand erst möglich gemacht. Als Kontrolle wird ein Versuch durchgeführt, bei dem statt eines Serums nur synthetisches Medium (SM) zugegeben wird.

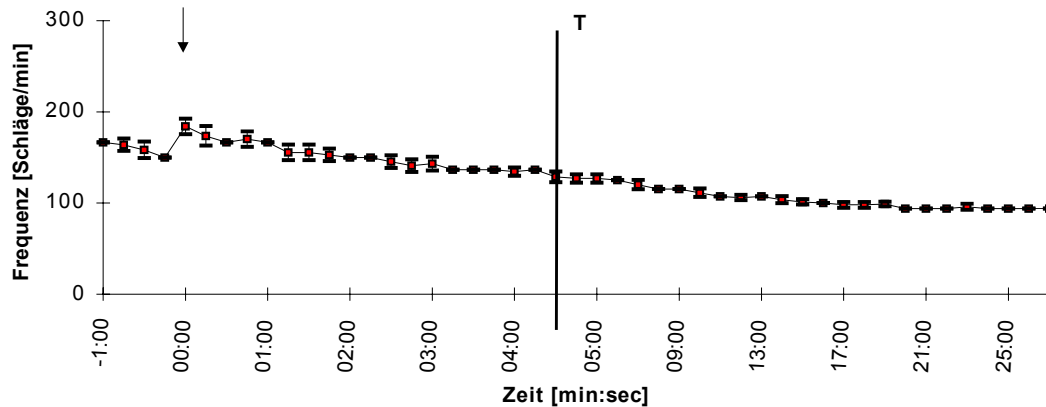


Diagramm 1: Frequenzverlauf eines typischen Kontrollversuches. Der Pfeil markiert die Zugabe von SM. Bis zum Zeitpunkt T wird die Frequenz alle 15 Sekunden bestimmt, danach einmal in der Minute. Dargestellt sind die Mittelwerte der Frequenz und die Standardabweichung, die aus Schwankungen der Frequenz bei den jeweils sechs ausgewerteten Kontraktionen resultiert (s. 2.4.2.).

In Diagramm 1 kann man erkennen, dass es nach Zugabe von SM weder zu einem Stillstand noch zu Arrhythmien der spontan schlagenden HMZ (erkennbar an den geringen Standardabweichungen an den einzelnen Messpunkten) kommt. Im Lauf der Zeit findet lediglich ein geringer Frequenzabfall statt. Auch bei den übrigen Kontrollen (n=4) fallen kein Stillstand oder andere auffällige Veränderungen der Kontraktionsfrequenz auf. Ein Einfluss der Mechanik des Mediumwechsels per se auf das Schlagverhalten des HMZ-Monolayers kann somit ausgeschlossen werden.

3.2.1.2. Auswirkungen induzierter Antikörper auf die Chronotropie der HMZ

Die Auswirkungen induzierter Antikörper auf die HMZ sollen untersucht werden. Dialysiertes Serum mit induzierten Antikörpern (K-RHS und K-RZK) wird nach dem unter 2.4.2. beschriebenen Protokoll in einer Verdünnung von 1:2 auf die spontan schlagenden HMZ gegeben. Es werden insgesamt 13 Versuche durchgeführt. In acht Versuchen wird dialysiertes Serum verwendet, in fünf nicht dialysiertes Serum.

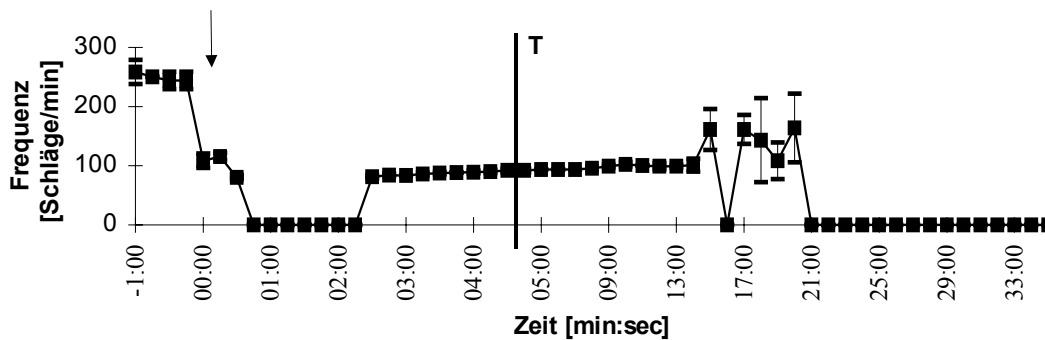


Diagramm 2: Typischer Frequenzverlauf eines Versuches mit dialysiertem K-RHS. Der Pfeil entspricht der Serumzugabe. Bis Zeitpunkt T Frequenzbestimmung alle 15 Sekunden, danach einmal pro Minute.

Kurz nach Einsetzen des Serums kommt es zu einem reversiblen Stillstand der Zellen, der jedoch nur in 6 von 13 Versuchen auftritt. In fünf dieser sechs Fälle war die Inkubation der Zellen mit dialysiertem Serum erfolgt. Die Ak-Titer der Seren aller 13 Versuche unterscheiden sich nicht. Der komplette Stillstand tritt frühestens 27'' und spätestens 52'' nach Serumzugabe auf (Mittelwert 42'' mit einer Standardabweichung von 9,3''). Die durchschnittliche Dauer des Stillstandes beträgt 121,8'' (SD 61,0''). In sieben der 13 Versuche tritt kein vorübergehender Stillstand der Zellen auf (Dia. 3).

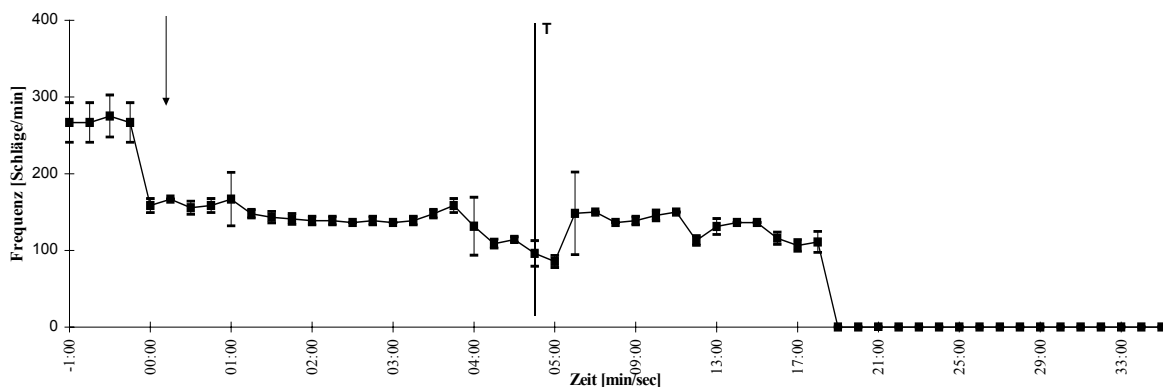


Diagramm 3: Typischer Frequenzverlauf der spontan schlagenden HMZ ohne Stillstand. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Serumzugabe (K-RHS). Bis zum Zeitpunkt T wird die Frequenz alle 15 Sekunden bestimmt, danach einmal in der Minute.

Nach frühestens 12,5 Minuten und spätestens 21 Minuten tritt in allen 13 Versuchen der endgültige Stillstand der Spontankontraktionen der Zellen ein (Mittelwert 18'39'' mit einer Standardabweichung von 2'44''). Dieser kann mit dem irreversiblen Funktionsverlust der Zellen gleichgesetzt werden. Wenn undialysiertes Serum eingesetzt wird, ist der endgültige Still-

stand etwas früher zu verzeichnen (MW 16'12", SD 2'59") als unter dem Einfluss dialysierten K-RHS (MW 20'11", SD 53").

In einigen Fällen (n = 2 von 13) kommt es zudem zu einer vollständigen Ablösung der Zellen vom Boden des Kulturgefäßes. In beiden Fällen waren Costar-Plates statt der sonst üblichen Falcon-Plates als Kulturgefäß benutzt worden.

Ein kurzfristiger Frequenzanstieg unmittelbar nach Serumzugabe, wie er unter dem Einfluss von xenogenen Antikörpern auftritt, ist nicht nachweisbar. Im Gegenteil, die durchschnittliche Kontraktionsfrequenz sinkt von 191 vor Serumzugabe um 49 auf 142 Schläge pro Minute 15 Sekunden danach ab. Bei einigen Versuchen steigt die Frequenz kurz vor dem endgültigen Stillstand noch einmal an.

In Diagramm 4 sind die Kurven aller 12 Versuche, bei denen die Zellen mit K-RHS inkubiert worden waren, übereinandergelegt. Es fällt auf, dass 21 Minuten nach Serumzugabe keine Zellen mehr schlagen.

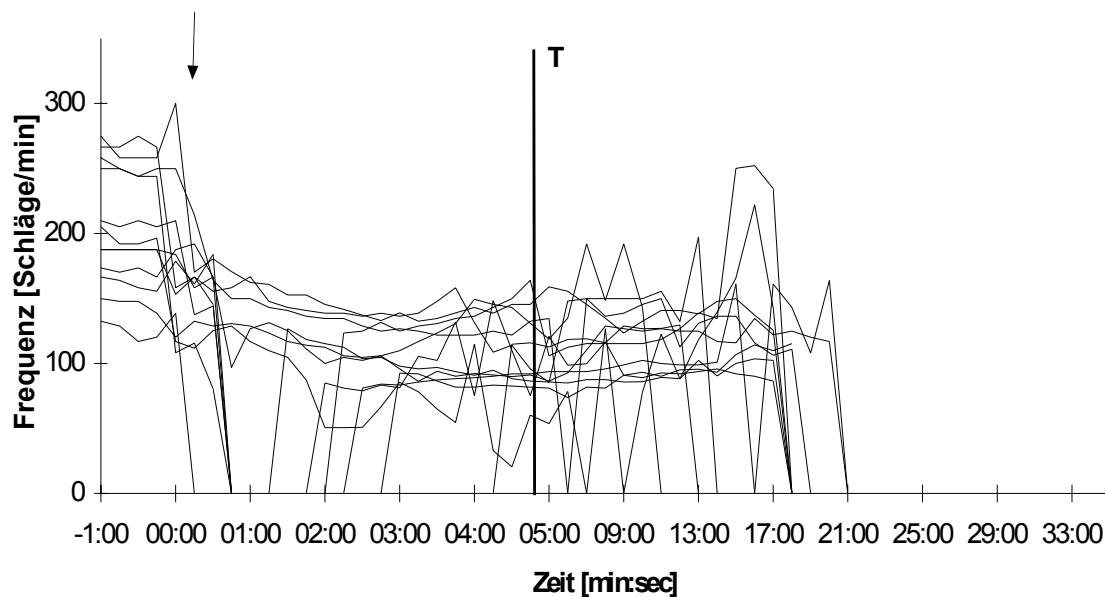


Diagramm 4: Alle Frequenzverläufe (12 Kurven) der Inkubation mit K-RHS (Kurzzeitversuche bis 30 min.) in einem Diagramm übereinanderprojiziert. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Serumzugabe. Bis zum Zeitpunkt T wird die Frequenz alle 15 Sekunden bestimmt, danach einmal in der Minute.

In Diagramm 5 sind die Kurven jener vier Versuche dargestellt, in denen das Serum eines mit kultivierten Kardiomyozyten immunisierten Kaninchens (K-RZK) verwendet wurde. Untersucht wird, ob die Immunisierung mit einer reinen HMZ-Suspension im Vergleich zu einem Gemisch aus Herzmuskelzellen, Fibrozyten und anderen Zellen zur Bildung spezifischerer

Antikörper und damit möglicherweise zu einer stärkeren Wirkung auf die Zellkulturen führt. In zwei Versuchen wird dialysiertes Serum, in den anderen nicht dialysiertes Serum verwendet.

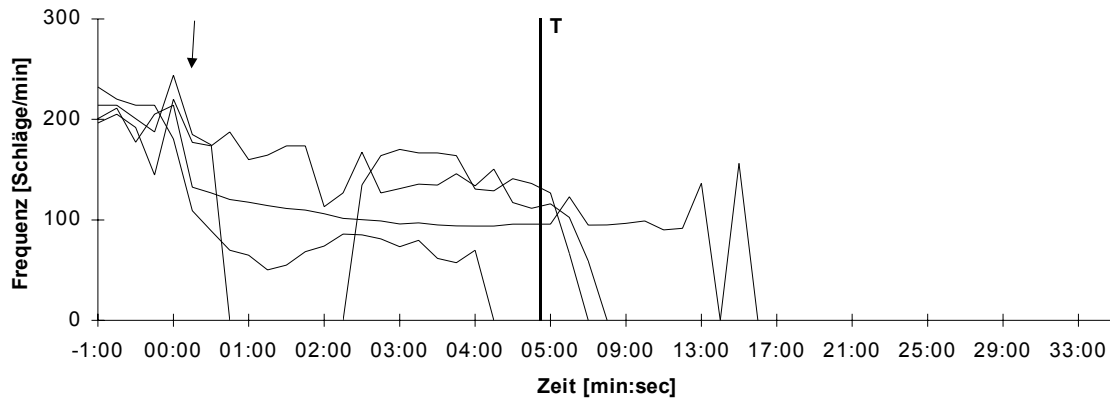


Diagramm 5: Alle Frequenzverläufe (4 Kurven) der Inkubation mit K-RZK (Kurzzeitversuche bis 30 min.) in einem Diagramm übereinanderprojiziert. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Serumzugabe. Bis zum Zeitpunkt T wird die Frequenz alle 15 Sekunden bestimmt, danach einmal in der Minute.

Bei einem von 4 Versuchen kommt es zu einem intermediären Stillstand mit einer Dauer von 99", zwischen 4'38 und 16'30" tritt in allen Versuchen der endgültige Stillstand (MW 9'47", SD 4'57") ein. Das ist hochsignifikant ($\alpha < 0,001$ mit T-Test) früher als unter Inkubation mit K-RHS. Wieder tritt der Stillstand unter nicht dialysiertem Serum etwas früher auf, im Mittel nach 9' im Vergleich zu 10'34". Die Hämagglutinationstiter liegen für K-RHS und K-RZK im gleichen Bereich.

3.2.1.3. Die Auswirkung der induzierten Antikörper auf weitere Kontraktionsparameter

Wie in 2.4. beschrieben, werden die Kontraktilitätsparameter der Zellen für die oben dargestellten Versuche bestimmt. Dargestellt sind die Werte zu den folgenden Messzeitpunkten:

1. unmittelbar vor Zugabe des IAK enthaltenden Serums;
2. 45 Sekunden nach Serumzugabe bzw. letzter Wert vor dem Stillstand;
3. unmittelbar, nachdem die Zellen wieder zu schlagen begonnen haben (nur bei Versuchen, in denen ein Stillstand auftrat);
4. zum Zeitpunkt des Maximums der Kontraktionsamplitude;
5. zum Zeitpunkt des Minimums der Amplitude nach Serumzugabe, aber vor Eintreten eines endgültigen Sistierens der Spontankontraktionen.

Die Ergebnisse der Inkubation mit K-RHS sind getrennt von denen der Inkubation mit K-RZK dargestellt. Beide Gruppen sind des weiteren aufgeteilt in Versuche, in denen es zu einem intermediären Stillstand kam und solche, in denen dieses Phänomen nicht auftrat.

In allen Gruppen sinkt die Frequenz nach Serumzugabe ab. Unter Inkubation mit K-RHS vermindert sich in den Versuchen mit intermediärem Stillstand die Amplitude nach der Serumzugabe, und das Serum wirkt negativ „inotrop“ und „lusitrop“. Selbst zum Zeitpunkt des Amplitudenmaximums sind die Werte ähnlich dem Ausgangswert. In den Versuchen **ohne** intermediären Stillstand nimmt die Amplitude nach der Serumzugabe zu und auch Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit steigen (mit Ausnahme des Zeitpunktes der minimalen Amplitude). Diese Veränderungen sind vor allem zum Zeitpunkt „nach Serumzugabe“ bzw. „vor dem Stillstand“ zu beobachten. In vielen Fällen liegt das Amplitudenminimum kurz vor dem endgültigen Stillstand.

Die Inkubation mit K-RZK führt zu den gleichen Ergebnissen, allerdings fallen in den Versuchen ohne intermediären Stillstand die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit nicht so deutlich wie unter K-RHS, sondern pendeln um das Niveau des Ausgangswertes.

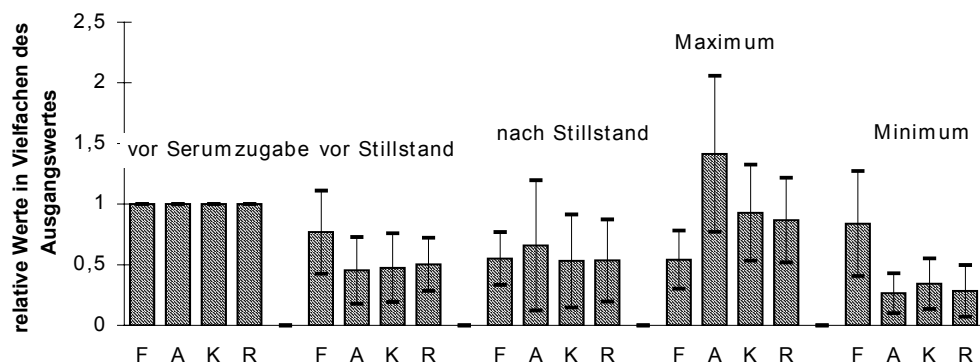


Diagramm 6: Kontraktionsparameter der HMZ unter Inkubation mit K-RHS, der Versuche, in denen ein intermediärer Stillstand auftrat. (F = Frequenz, A = Amplitude, K = Kontraktionsgeschwindigkeit, R = Relaxationsgeschwindigkeit). Dargestellt ist $x \pm SD$, $n = 6$.

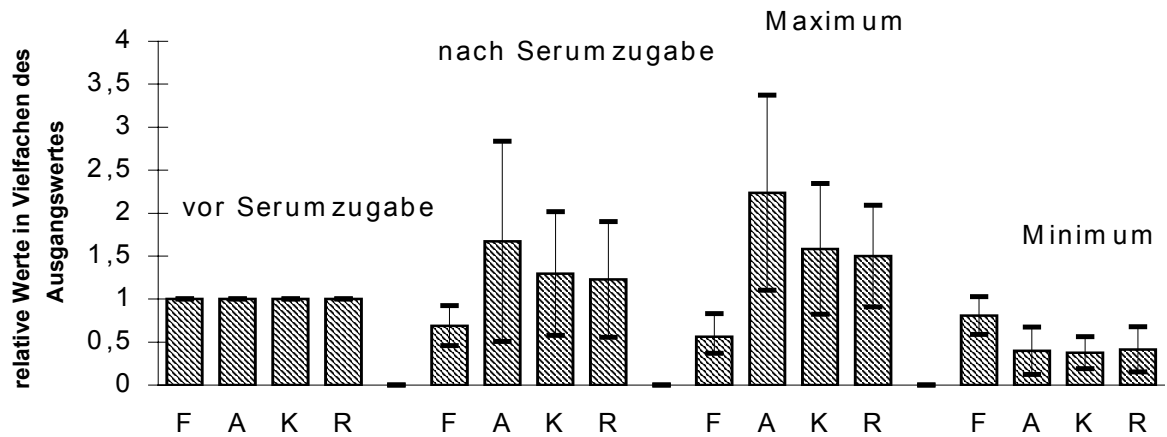


Diagramm 7: Kontraktionsparameter der HMZ unter Inkubation mit K-RHS der Versuche, in denen **kein** intermediärer Stillstand auftrat. Dargestellt ist $\bar{x} \pm SD$, $n = 7$.

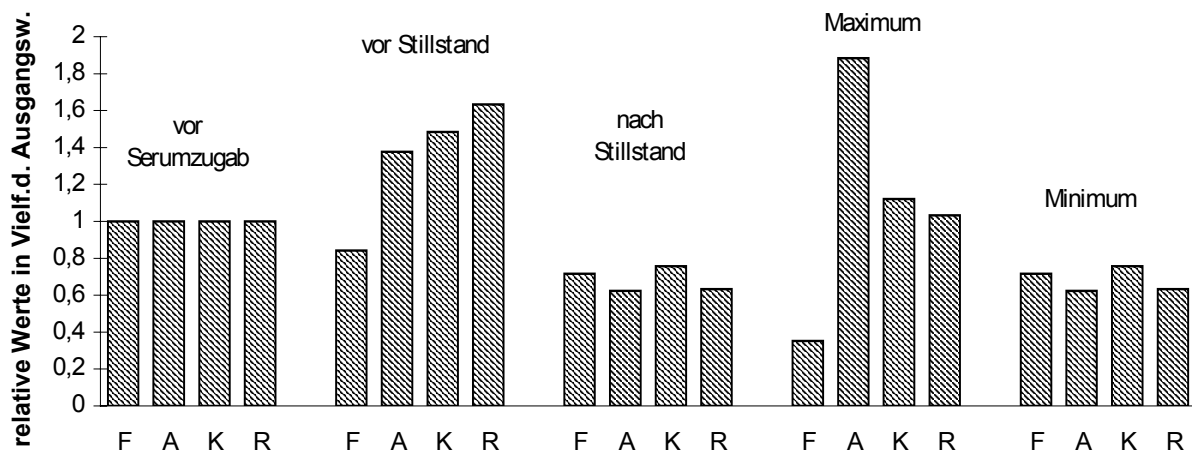


Diagramm 8: Kontraktionsparameter der HMZ unter Inkubation mit K-RZK des Versuches ($n=1$), in dem ein intermediärer Stillstand auftrat.

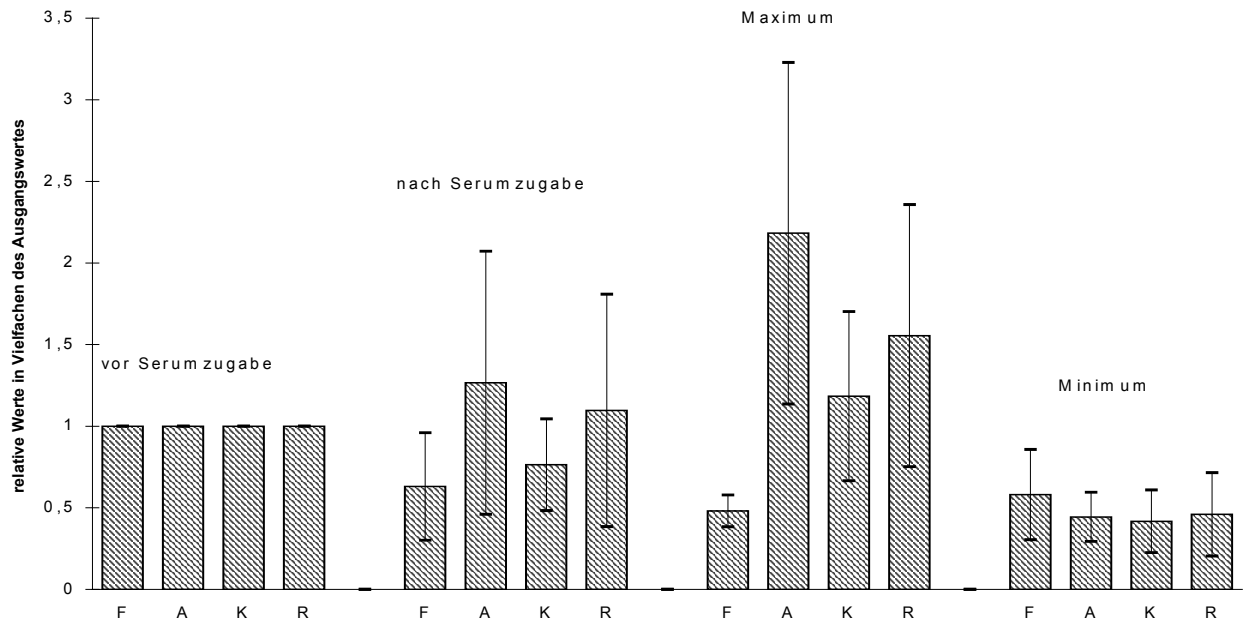


Diagramm 9: Kontraktionsparameter der HMZ unter Inkubation mit K-RZK der Versuche, in denen **kein** intermediärer Stillstand auftrat. Dargestellt ist $\bar{x} \pm SD$, $n = 3$.

Zusammenfassend kann man also sagen:

Nach Zugabe von Serum mit IAK sinkt die Frequenz; es kommt in jedem Fall zu einem irreversiblen Kontraktilitätsverlust, zuvor jedoch uneinheitlich zu einem vorübergehenden Stillstand und Alternationen der Pulsationsparameter.

3.2.2. Frequenzverhalten bei Inkubation über 60 min. in Abhängigkeit von der Serumkonzentration

Wenn die zytotoxische Wirkung der Seren auf einem Zusammenspiel zwischen induzierten Antikörpern und dem Komplementsystem beruht, sollte eine Veränderung der Serumkonzentration und damit eine Verminderung des zytotoxischen Agens Auswirkungen auf die Latenz des irreversiblen Funktionsverlustes haben. Um dies zu überprüfen, werden die Zellen mit verschiedenen SM/Serumgemischen inkubiert.

Pro Gruppe wurden 24 Versuche zur Untersuchung des Frequenzverhaltens über eine Stunde durchgeführt. In sechs Versuchen wurde das Komplementsystem inaktiviert. Pro Versuchstag wurden die Zellen in jeweils sechs Kulturlöchern untersucht. Es handelt sich also um die Daten von vier Versuchstagen (Tabelle 3 und Diagramm 10).

Gruppe	vor Zugabe		15 min.		30 min.		45 min.		60 min.	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Kontr.	22	11	25	12	23	11	22	10	21	12
1:2	18	9	18	11	7	11	6	10	5	9
1:4	22	9	18	12	14	15	12	14	9	14
1:8	19	10	15	10	17	12	17	12	15	16
1:16	20	12	19	10	16	11	17	11	17	12
1:32	20	14	16	12	20	13	17	13	19	13
1:2, ina.	19	14							21	9

Tabelle 3: Mittlere Frequenzen (MW) und Standardabweichungen für die Inkubation mit Iak. (n =24).

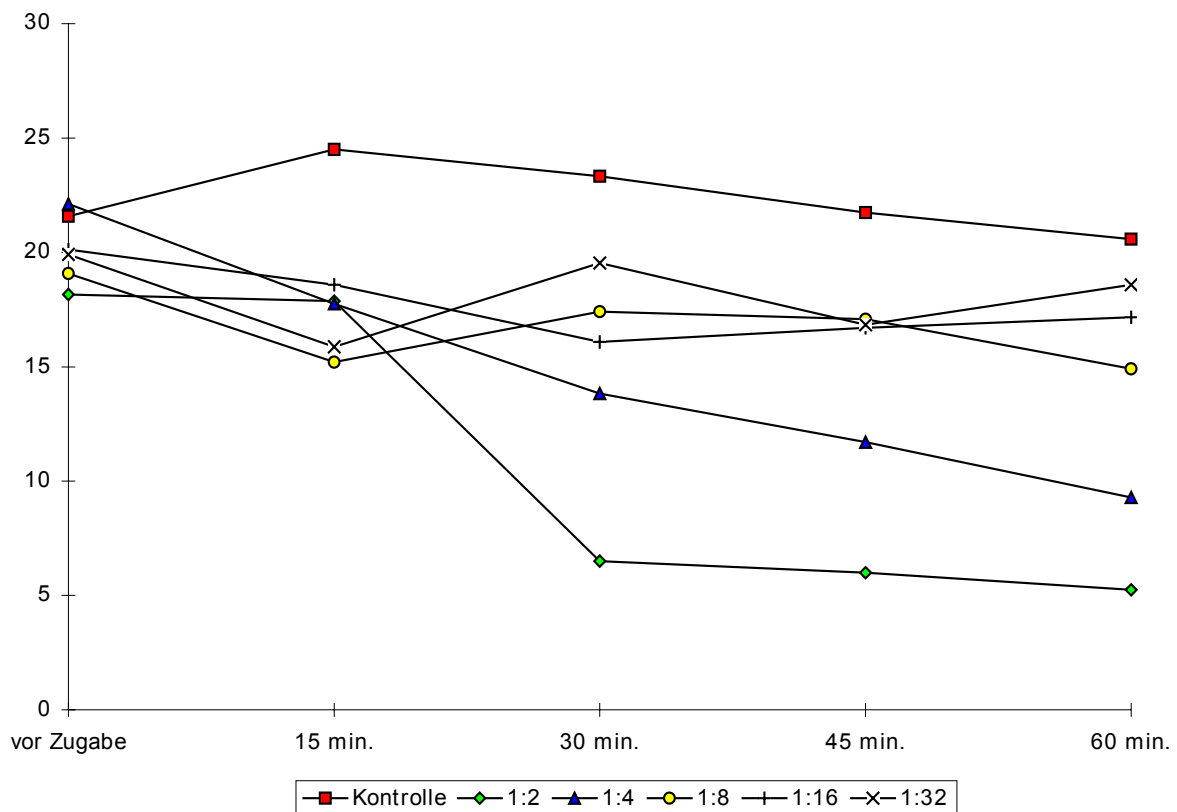


Diagramm 10: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Frequenzen aus Tabelle 3.

Da es sich bei den verwendeten Zellen um spontan schlagende Kulturen in unterschiedlichen Gefäßen handelt, sind die Frequenzen teilweise stark unterschiedlich. Die daraus resultierenden hohen Standardabweichungen würden die Graphik unübersichtlich machen und wurden deshalb nicht eingetragen. Die höheren Konzentrationen von induzierten Antikörpern führen zu einem eindeutigen Frequenzabfall. Unter der Serumverdünnung 1:2 kommt es an drei von vier Versuchstagen zu einem kompletten Stillstand aller Zellen nach einer Stunde. Dieser tritt an zwei Tagen spätestens nach 30 min. ein. Das bei 56°C über 30 min. inaktivierte Serum (kein funktionsfähiges Komplementsystem mehr vorhanden) führt zu keinem Frequenzabfall.

3.2.3. Einfluss von unterschiedlichen Serumaufbereitungen auf die Zellen

Um zu untersuchen, welche Bestandteile des Kaninchenserums den Stillstand der HMZ bewirken, wird ein Versuchsprotokoll mit drei Gruppen erstellt. Die HMZ werden entweder mit Serum inkubiert, das wie in den vorangegangenen Versuchen außer durch Dialyse nicht weiter bearbeitet wurde. Zu einer zweiten Gruppe von HMZ wird inaktiviertes Serum zugegeben (siehe 2.2.6.), um die Wirkung des Komplementsystems zu testen. Eine dritte Gruppe dient der Inkubation mit Serum, dessen Antikörper vor der Dialyse absorbiert wurden (siehe 2.2.5.), um in einem substraktiven Ansatz die Wirkung der gegen Ratte gerichteten Antikörper zu definieren. Des weiteren wird untersucht, ob K-RZK einen anderen Effekt auf die Zellen hat als K-RHS. Dies wäre aufgrund der höheren Spezifität der Antikörper – in der verimpften Zellkultur sind praktisch keine Fibroblasten und andere „Verunreinigungen“ enthalten – durchaus möglich.

Die Zellen werden mit jeweils einer dieser Seren parallel für zwei Stunden inkubiert (Tabelle 4 und im Diagramm 11).

		0 h	2 h	Anzahl
Kontrolle	<i>MW</i>	39	38	18
	<i>SD</i>	20	18	
K-RHS	<i>MW</i>	37	0	18
	<i>SD</i>	14	0	
inakt.	<i>MW</i>	35	30	18
	<i>SD</i>	22	9	
absorb.	<i>MW</i>	35	30	12
	<i>SD</i>	20	8	
K-RZK	<i>MW</i>	31	0	6
	<i>SD</i>	23	0	

Tabelle 4: Mittlere Frequenzen und Standardabweichungen der verschiedenen Gruppen vor Serumzugabe und zwei Stunden danach.

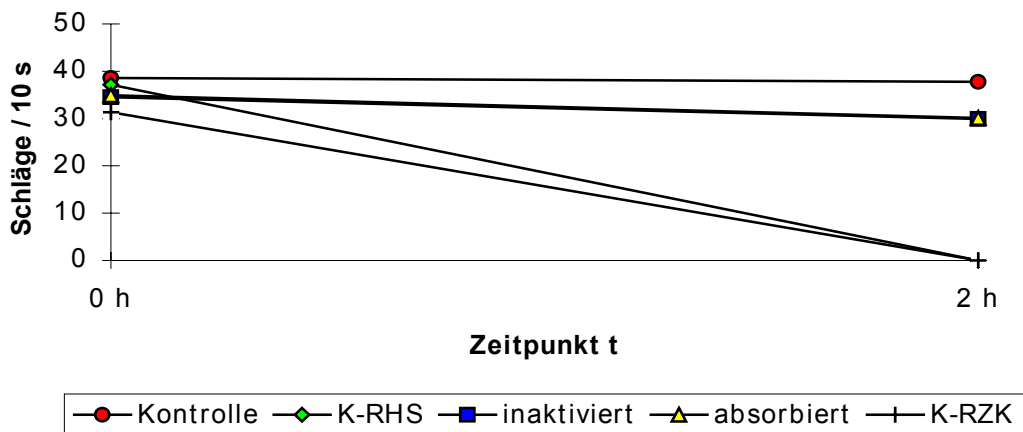


Diagramm 11: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Frequenzen aus Tabelle 4.

Die Inkubation mit induzierten Antikörpern (K-RHS und K-RZK) führt in allen Versuchen zu einem anhaltenden Stillstand der Zellen, so dass zum Zeitpunkt $t = 2$ h keine schlagenden Zellen in den entsprechenden Kulturlöchern gefunden werden können. Die absorbierten bzw. inaktivierten Seren ändern das Schlagverhalten der HMZ im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht. Sowohl ein funktionell intaktes Komplementsystem als auch die Anwesenheit spezifischer Antikörper scheinen an der zum Sistieren der Spontankontraktionen führenden zytotoxischen Wirkung beteiligt zu sein.

3.2.4. Frequenzverhalten bei Inkubation über vier Stunden in Abhängigkeit von der Serumkonzentration

Um ergänzend zur Dosis-Wirkungsbeziehung bei Beobachtung über eine Stunde die Kinetik des zytotoxischen Effektes zu analysieren, wird der Einfluss verschiedener Serumverdünnungen auf das Schlagverhalten der HMZ in einem weiteren Ansatz über vier Stunden untersucht. Hier wird das zytotoxische Serum (K-RHS) in einer Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:32 eingesetzt. Die Zellen werden vor Serumzugabe und daran anschließend stündlich bis einschließlich des Zeitpunktes $t = 4$ Stunden beobachtet. Dabei werden in je drei Gesichtsfeldern pro Kulturloch für je 10 Sekunden die Frequenzen ausgezählt. Die Anzahl der untersuchten Kulturlöcher (entsprechend funktionellen Synzytien) beträgt pro Gruppe und Zeitpunkt für die Serumverdünnung 1:2 27, für die Verdünnung 1:32 42 und für alle anderen Versuchsgruppen 45 (Ergebnisse in Tabelle 5 und in Diagramm 12).

		vor Zugabe	1 h	2 h	3 h	4 h
Verd. 1:2	<i>MW</i>	28,22	0	0	0	0
	<i>SD</i>	24,53	0	0	0	0
Verd. 1:4	<i>MW</i>	22,44	1,86	1,08	0	0
	<i>SD</i>	24,53	8,18	6,50	0	0
Verd. 1:8	<i>MW</i>	28,61	32,97	5,64	3,06	3,06
	<i>SD</i>	22,80	23,61	16,22	12,78	12,78
Verd. 1:16	<i>MW</i>	15,94	35,89	35,39	29,53	17,72
	<i>SD</i>	22,44	21,53	25,49	26,95	24,54
Verd. 1:32	<i>MW</i>	16,00	23,78	14,03	29,69	24,81
	<i>SD</i>	21,06	21,27	16,77	18,93	19,32
Kontrolle	<i>MW</i>	29,00	18,11	13,67	13,50	13,53
	<i>SD</i>	23,13	19,19	16,65	19,03	16,83

Tabelle 5: Ergebnisse der Frequenzzählungen für Inkubation mit K-RHS über 4h.

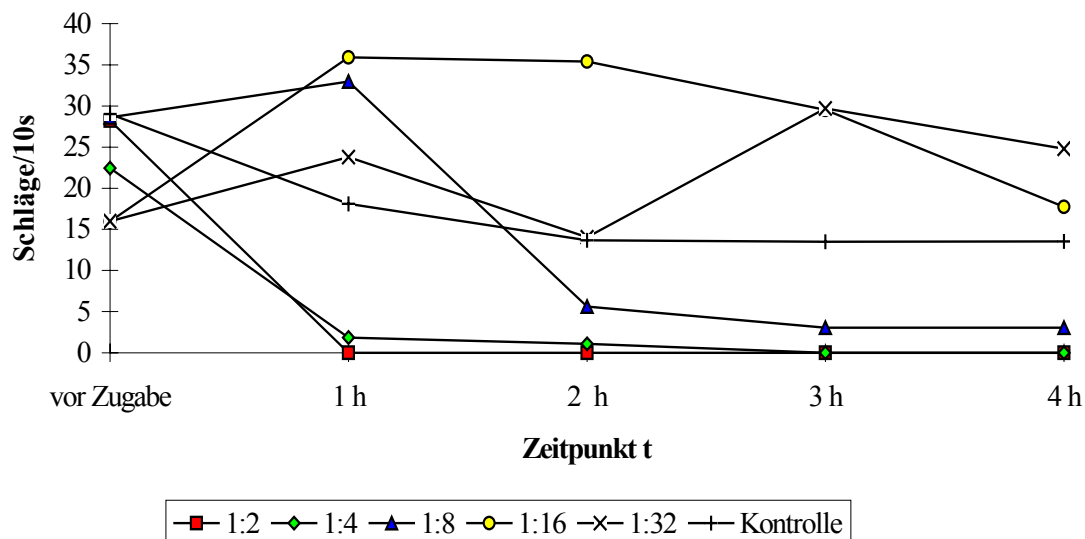


Diagramm 12: Graphische Darstellung der Werte aus Tabelle 6.

Aufgrund der Variabilität der spontan schlagenden Zellen kann es manchmal vorkommen, dass die Zellen in einem Kulturloch überhaupt nicht schlagen. An einem Versuchstag werden diese Zellen durch in das Inkubationsmedium gehängte Elektroden elektrisch stimuliert. Zellen, die vor Zugabe des Serums, also zum Zeitpunkt $t = 0$ h, nicht schlagen, sind elektrisch stimulierbar. Teilweise schlagen die Zellen nach diesem kurzzeitigen „Pacing“ auch wieder spontan weiter. Bei der letzten Frequenzzählung ($t = 4$ h) wird diese elektrische Stimulation wiederholt. Zu diesem Zeitpunkt sind die nicht schlagenden (zwei von sechs Kulturlöcher) Zellen der Kontrollgruppe wie zu Beginn des Versuches stimulierbar und schlagen im An-

schluss an das kurzzeitige „Pacing“ spontan weiter. Zellen der Versuchsgruppen, die mit induzierten Antikörpern inkubiert wurden, sind elektrisch **nicht** stimulierbar.

Im Vergleich zur 60minütigen Inkubation zeigt sich, dass die Serumverdünnung 1:8 im Laufe der längeren Einwirkungszeit auch zum Stillstand eines Großteils der Zellen (43 von 45 Kulturlöcher nach vier Stunden, 41 von 45 bereits nach zwei Stunden) führt. Die Frequenzmittelwerte scheinen durch die beiden höchsten Verdünnungen (1:16 und 1:32) etwas gesteigert zu werden. Nach vierstündiger Inkubation mit der Serumverdünnung 1:16 schlagen allerdings die Zellen in 30 von 45 Kulturlöchern nicht. Nach Inkubation mit der Verdünnung von 1:32 kontrahieren sich die HMZ immerhin noch in 13 von 42 Fällen. Viele der nach vier Stunden noch schlagenden Zellen haben eine sehr hohe Frequenz (mehr als 55 Schläge pro zehn Sekunden bzw. mehr als 330 Hertz).

Um sicherzugehen, dass die Dialyse keine wesentliche Abschwächung der Zytotoxizität speziell in höheren Serumverdünnungen bewirkt (z.B. durch Komplementverbrauch oder -verlust während der Dialyse), wird die vierstündige Inkubation nach obigem Schema auch mit nicht dialysiertem Serum durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Diagramm 13 abgebildet.

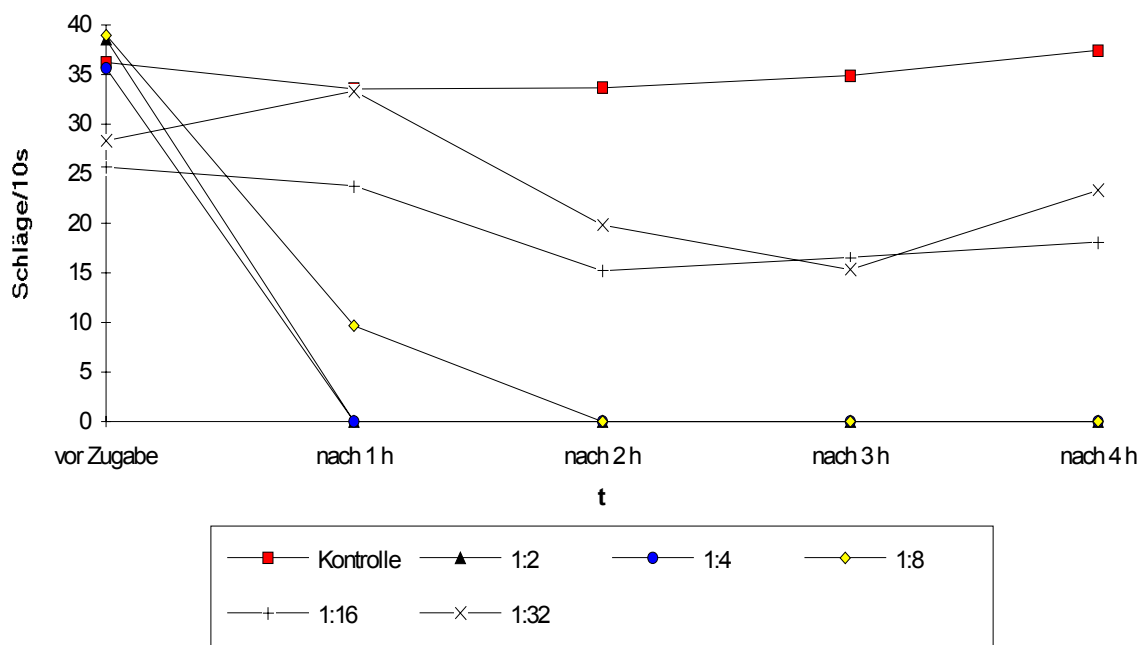


Diagramm 13: Die Mittelwerte der Frequenzen bei Inkubation der Zellen mit nicht dialysiertem Serum über 4 h. Anzahl $n_{1:2} = 27$, $n_{1:32} = 42$, alle übrigen Gruppen $n = 45$.

Im Vergleich zu dialysiertem Serum (Diagramm 12) wirkt das **undialysierte** Serum etwas stärker. In der Verdünnung 1:8 stehen bereits nach einer Stunde sieben von neun funktionellen Synzytien, ab $t=2h$ finden sich keine schlagenden Zellen mehr. Die höhere Serumverdünnung 1:16 bewirkt nach vier Stunden in 2/3 (6 von 9) der Kulturlöcher einen kompletten Stillstand.

3.2.5. Verhalten der Zellen bei Inkubation über 24 Stunden bei hoher Serumverdünnung

Die HMZ werden mit K-RHS in einer Verdünnungsreihe mit SM von 1:16 bis 1:256 über 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden schlagen die Zellen, die den beiden höchsten Serumkonzentrationen (1:16 und 1:32) ausgesetzt waren, nicht mehr und scheinen vom Boden der Kulturgefäße (6er-Plates) abgelöst. Alle anderen HMZ, die mit höheren Verdünnungen inkubiert waren, zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit reinem SM inkubiert wurde, keinen Unterschied in der Kontraktionsfrequenz.

3.3. Zytotoxizität der IAK und PNAk im Vergleich

3.3.1. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Inkubation mit induzierten Antikörpern führt zu keinen besonderen Änderungen im gemessenen Proteingehalt der Kulturgefäße. Allenfalls ein leichter konzentrationsabhängiger Abfall der Proteinmenge bei höheren Konzentrationen von K-RHS ist auffällig. Exemplarisch sind die Daten der Inkubation mit K-RHS in Konzentrationen von 1:2 bis 1:32 über 4 h dargestellt (aus je 12 Kulturlöchern pro Verdünnung).

	Mittelwert	SD
1:2	484	31
1:4	466	52
1:8	522	38
1:16	536	74
1:32	590	43
Kontrolle	595	18

Tabelle 6: Proteingehalt der Kulturlöcher [μg] nach Inkubation über 4 h mit Seren, die induzierte Antikörper enthalten. Angegeben sind serielle Verdünnungen mit SM. Für alle Gruppen gilt $n = 12$.

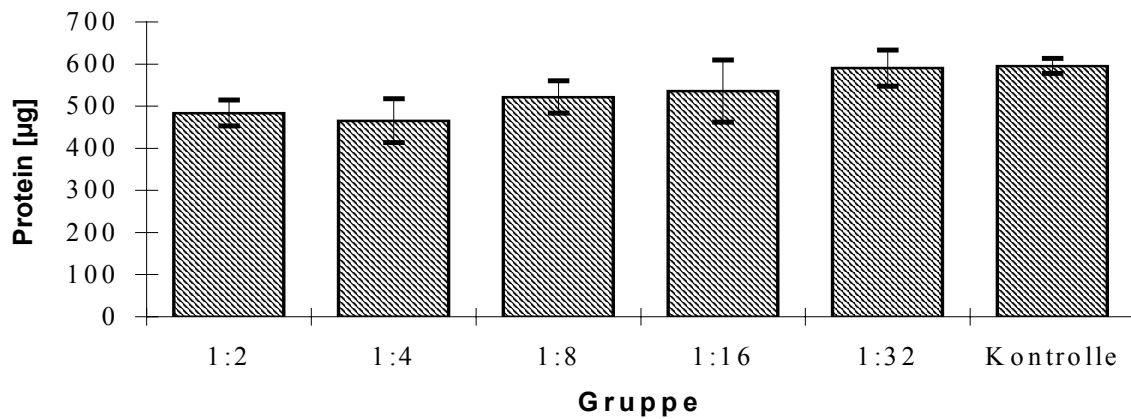


Diagramm 14: Proteingehalt der Kulturlöcher [µg] nach Inkubation mit verdünnten Seren, die induzierte Antikörper enthalten, über 4 h in graphischer Darstellung.

Auch Inaktivierung des Komplementsystems oder Absorption der induzierten Antikörper führt nur zu unwesentlichen Unterschieden der gemessenen Proteinkonzentrationen, die kleiner sind als die Standardabweichungen der einzelnen Gruppen in sich (siehe Diagramm 15). Das heißt, diese Unterschiede sind nicht verwertbar.

	MW	SD	Anzahl
Kontrolle	711	63	18
K-RHS	718	64	18
INA	753	81	18
ABS	701	29	12
K-RZK	731	18	6

Tabelle 7: Proteingehalt der Kulturgefäße [µg] für die Inkubation der HMZ über 2 h mit verschiedenen Aufbereitungen von K-RHS (INA: Komplement inaktiviert; ABS: Antikörper absorbiert), K-RZK und eine Kontrollgruppe (SM).

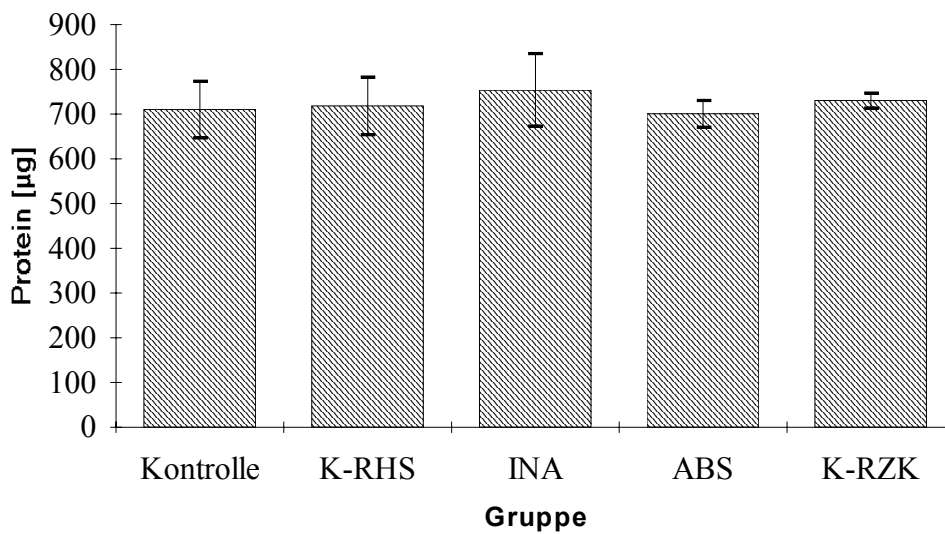


Diagramm 15: Graphische Darstellung der Proteinmessungen aus Tabelle 7. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Die Inkubation der HMZ mit humanem xenogenem Serum (XS) mit PNAk über 12 h führt zu einer signifikanten ($\alpha=0,01$) Erhöhung des Proteingehaltes pro Kulturloch im Vergleich zur serumfreien Kontrolle. Die Zunahme der Proteinmenge bei längerer Inkubation dürfte auf einer Vermehrung der Fibroblasten unter dem Einfluss der mit dem humanen Serum zugeführten Wachstumsfaktoren liegen. Xenogenes Serum, in dem sowohl das Komplementsystem inaktiviert als auch die Anti-Ratten-Antikörper absorbiert wurden, führt zu einem noch stärkeren Zuwachs der Proteinmenge ($\alpha=0,05$ bei multiplen Vergleichen nach Scheffé).

	Mittelwert	Standabw.	Anzahl
Kontrolle	465	105	18
XS	568	116	18
XSia	637	53	6

Tabelle 8: Proteingehalt der Zellkulturgefäße [µg] nach Inkubation mit PNAk-haltigem Serum über 12 h. XS: humanes xenogenes Serum; XSia: xenogenes Serum nach Inaktivierung und Ak-Absorption.

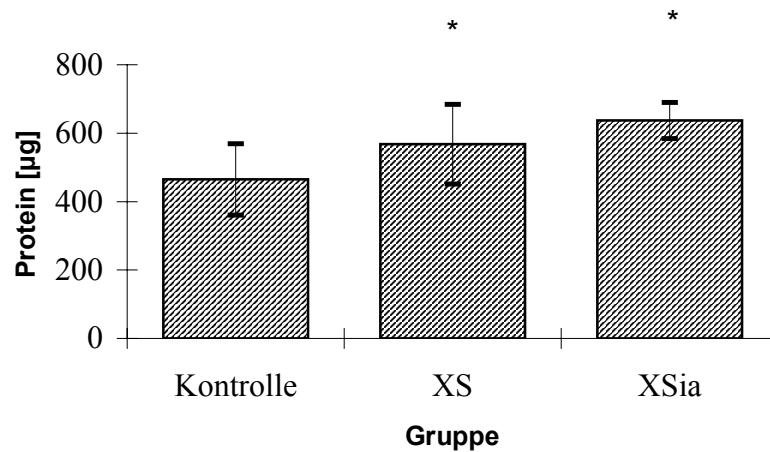


Diagramm 16: Graphische Darstellung des Proteingehaltes pro Kulturloch nach Inkubation über 12 Stunden (Gruppen und Werte siehe Tabelle 8). *: XS ist signifikant unterschiedlich zu Kont. und XSia ($\alpha=0,01$) und XSia zu den anderen beiden Gruppen ($\alpha=0,05$).

Eine Zunahme der Proteinmenge im Überstand tritt auch nach einer Inkubation mit XS über 24 h auf. In weiteren Versuchen, in denen die Zellen für sechs Stunden mit XS inkubiert werden, in dem entweder nur die PNAk absorbiert (XSa) oder die Komplementfaktoren inaktiviert (XSi) sind, führt dies in allen Fällen zu einer weiteren Zunahme der Proteinmenge im Vergleich zur Inkubation mit unbehandeltem XS. XSa und XSi sind signifikant ($\alpha=0,01$) unterschiedlich von XS und Kontrolle (multiple Vergleiche nach Scheffé).

	Mittelwert	Standabw.	Anzahl
Kontrolle	557	29	12
XS	568	36	12
XSa	700	37	12
XSi	674	40	12

Tabelle 9: Proteingehalt [µg] von Kulturlöchern (Sechslach-Platten) nach sechsstündiger Inkubation mit xenogenem Serum in verschiedenen Aufbereitungen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

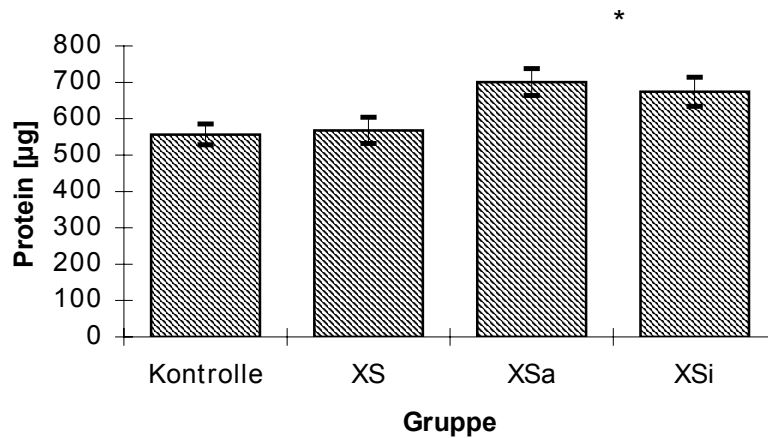


Diagramm 17: Graphische Darstellung der Proteingehalte nach 6 h Inkubation mit xenogenem Serum (Daten aus Tabelle 9). XSa = xenogenes Serum, absorbiert; XSi = XS, Komplement hitzeinaktiviert. *: XSa und XSi sind signifikant unterschiedlich von den anderen beiden Gruppen ($\alpha=0,01$).

3.3.2. Kalium pro Protein

Die Bestimmung der Proteinmenge allein vermag eine zytotoxische Wirkung nicht zu beweisen. Auch die Frequenzmessungen erlauben nicht, zwischen rein kardioplegischen und zytotoxischen Effekten der Antikörper zu differenzieren. Hier kann die Messung des zellulären Kaliumgehaltes helfen. Gemessen wird das Kalium, das am Ende der Inkubation in den noch adhären Zellen verblieben ist. Je stärker diese Zellen geschädigt werden, desto weniger Kalium ist in den Restzellen noch vorhanden.

Das in den Zellen enthaltene Kalium, bezogen auf den jeweiligen Proteingehalt nach einstündiger Inkubation mit induzierten Antikörpern, ist im folgenden dargestellt. Hierbei werden die Zellen einer seriellen Verdünnungsreihe des Serums von 1:2 bis 1:32 ausgesetzt. Um den Anteil des Komplementsystems zu untersuchen, wird ein Teil des Serums der Verdünnung 1:2 inaktiviert und unter sonst gleichen Bedingungen eingesetzt.

Gruppe	Kalium/Protein [nmol/mg]	SD
Kontrolle	159	41
1:2	28	26
1:4	35	28
1:8	70	51
1:16	127	82
1:32	149	65
1:2, inakt.	204	9

Tabelle 10: Proteinbezogener Kaliumgehalt nach einstündiger Inkubation der Zellen mit IAK-haltigem Serum (K-RHS), *n* pro Gruppe = 18, für inaktiviertes Serum *n* = 6.

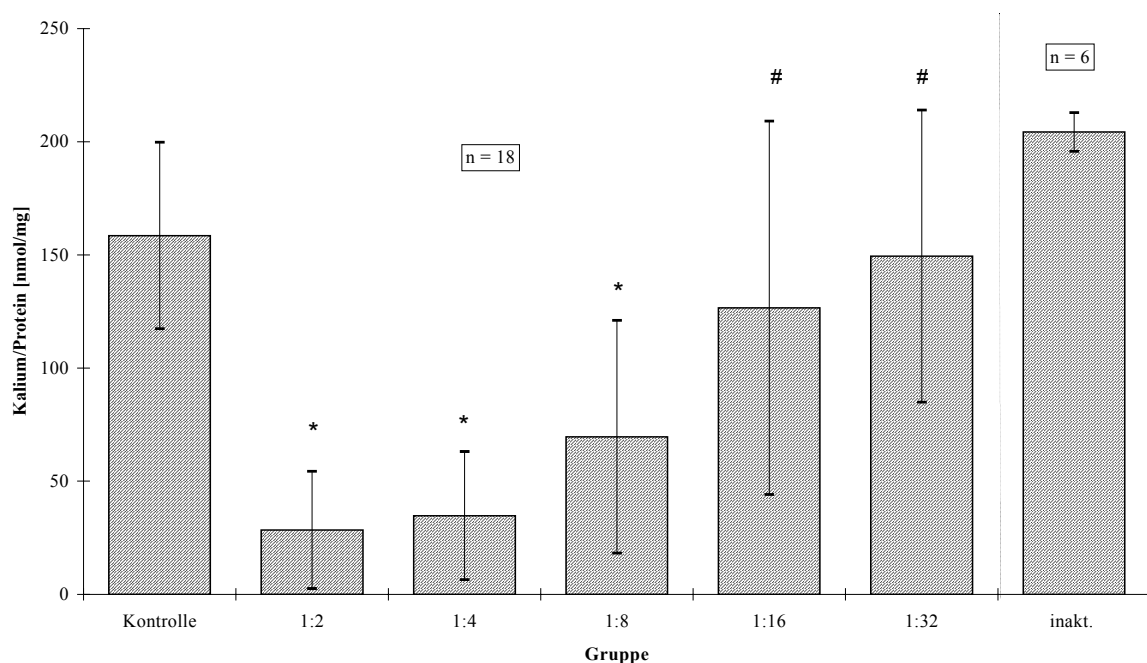


Diagramm 18: Darstellung der Daten aus Tabelle 10 in einem Säulendiagramm. *: signifikanter Unterschied zur Kontrolle, #: signifikanter Unterschied zu den Gruppen 1:2 und 1:4 (jeweils für $\alpha=0,05$)

Die Inkubation mit induzierten Antikörpern in abnehmenden Verdünnungen führt zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der am Ende der Inkubation noch in den Zellen enthaltenen Kaliummenge. Die Verminderung des Kaliumwertes ist abhängig vom Grad der Zellschädigung bzw. der Anzahl der geschädigten Zellen. Das heißt, die Zellen werden durch die IAK konzentrationsabhängig geschädigt. Durch Inaktivierung des Komplementsystems wird dieser Effekt aufgehoben. Diese Unterschiede sind signifikant (Kruskal-Wallis-Test und multiple Vergleiche nach Nemenyi) zwischen Kontrolle und den drei niedrigsten Verdünnungen sowie zwischen den beiden niedrigsten (1:2 und 1:4) und höchsten (1:16 und 1:32) Verdün-

nungen. Außerdem herrscht Signifikanz für die Verschiedenheit der Gruppen 1:8 und 1:32. Die übrigen Unterschiede sind nicht signifikant.

Es wird untersucht, ob verschiedene Serumaufbereitungen eine unterschiedlich starke Verminderung der Kaliumkonzentration hervorrufen. Nach Vorversuchen wurde für diese Versuche eine Inkubationszeit von zwei Stunden gewählt, da sich nach dieser Zeitspanne ein noch deutlicherer Kaliumabfall zeigt. Mögliche Erklärungen für diese vergleichsweise lange Zeitdauer liegen in einer langsamen Diffusion oder auch Auswaschung des Kaliums aus den gestörten Zellen. Bei Inkubation über zwei Stunden ergeben sich die in Tabelle 11 dargestellten Werte.

	Mittelwert	Stabw.	n
K-RHS	8	8	18
K-RZK	1	1	6
INA	189	13	18
ABS	189	16	12
Kontrolle	188	13	18

Tabelle 11: Kalium/Protein nach einer zweistündigen Inkubation der Zellen mit K-RHS, weiter aufbereitetem K-RHS (INA und ABS), K-RZK und einer Kontrollgruppe (SM).

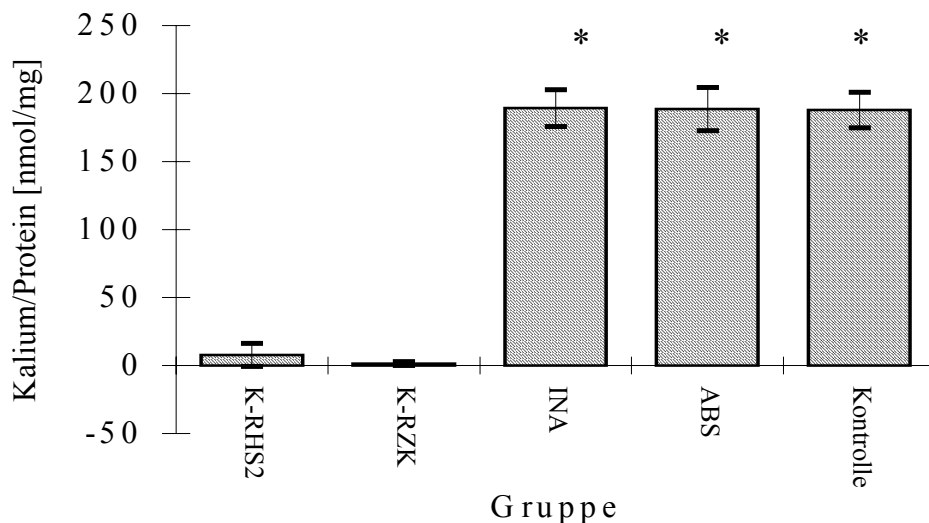


Diagramm 19: Die Kalium-pro-Proteinwerte nach zweistündiger Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Seren (Daten aus Tabelle 11). *: Die ersten zwei Gruppen unterscheiden sich hochsignifikant ($\alpha=0,001$) von den drei letzten.

Die Inkubation der Zellen mit induzierten Antikörpern (K-RHS und K-RZK) führt zu einer Schädigung der Zellmembran und zu einem daraus resultierenden Ausstrom von Kalium aus den Zellen. Die in den Zellen zurückbleibende, gemessene Kaliummenge liegt nahezu bei Null. Im Gegensatz dazu verliert das Serum sowohl durch die Absorption der Anti-Rattenherz-Antikörper (ABS) als auch die Inaktivierung des Komplementsystems (INA) seine Zytotoxizität. Es zeigen sich im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede in der Kaliummenge pro Protein, die sich am Ende der Inkubation noch in den Zellen befindet. Die Kalium/Protein-Werte der Gruppen INA, ABS und Kontrolle sind hochsignifikant größer als die der Gruppen K-RHS und K-RZK ($\alpha=0,001$).

Eine zytolytische Wirkung des Komplementsystems würde man schon nach relativ kurzer Inkubationszeit erwarten. Deshalb wird eine Zeitkinetik über 30 min gemessen, die sich folgendermaßen darstellt (Tabelle 12):

t [min]	Kalium/Protein
5	211
10	191
15	148
20	154
25	139
30	126

Tabelle 12: Zeitkinetik über 30 Minuten von Kalium/Proteinwerten [nmol/mg] unter Inkubation mit K-RHS.

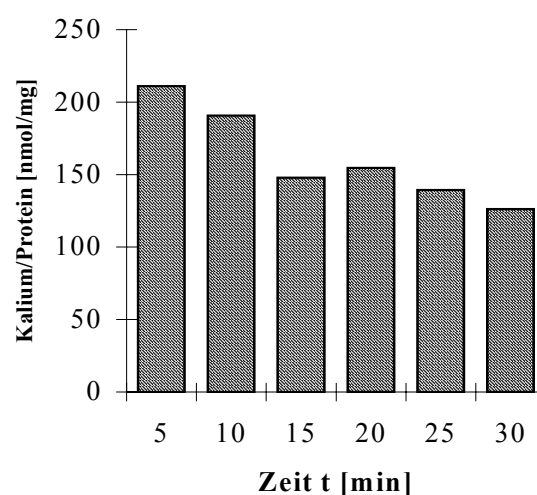


Diagramm 20: Graphische Darstellung der Werte aus Tabelle 12.

Man beobachtet einen zeitabhängigen Abfall des Kaliums pro Protein. Allerdings sinkt der Wert auch zum Zeitpunkt $t=30$ min. nicht auf Null, sondern nur bis auf ca. 60% des Ausgangswertes.

Zusammenfassend kann man sagen: Die induzierten Antikörper führen zu einem von der Dauer der Inkubation abhängigen Rückgang der Kaliumkonzentration, d.h. die Zellen werden geschädigt. Dieser Effekt wird durch Absorption der Antikörper oder Inaktivierung des Komplementsystems aufgehoben.

Xenogenes Serum hat keinen vergleichbaren Effekt auf die Zellen. Selbst nach 24 Stunden findet sich nur eine vergleichsweise geringe Änderung der Kaliumkonzentration pro Protein. Die Werte betragen 193 nmol/mg (Standardabweichung von 47) für die Kontrolle und 169 nmol/mg (Standardabweichung 92) für 1:2 verdünntes humanes xenogenes Serum. Diese Ergebnisse sind in Diagramm 21 dargestellt.

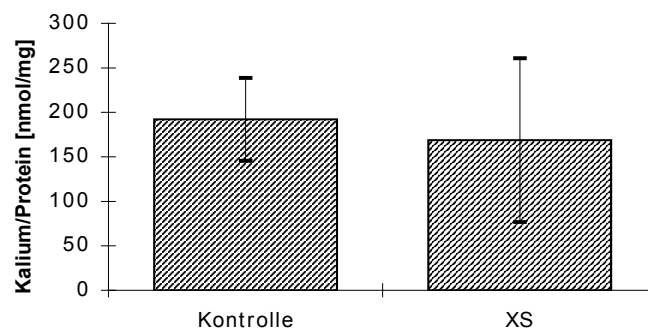


Diagramm 21: Das nach 24stündiger Inkubation mit PNAk noch in den Zellen verbliebene Kalium, bezogen auf die Proteinkonzentration.

3.3.3. Messung der energiereichen Phosphate mit der HPLC

In den Zellen, die mit induzierten Antikörpern befüttert wurden, ist praktisch kein Adenosin-Triphosphat (ATP), Creatinphosphat (CP) und Guanosin-Triphosphat (GTP) mehr nachweisbar. Im Vergleich dazu sind die Werte nach Inkubation mit SM (Kontrolle) noch deutlich höher. Daraus lässt sich schließen, dass die Kardiomyozyten durch den Einfluss der Antikörper und des Komplementsystems zerstört wurden. Dies korreliert gut mit den Ergebnissen aus der Kaliummessung und der Elektronenmikroskopie.

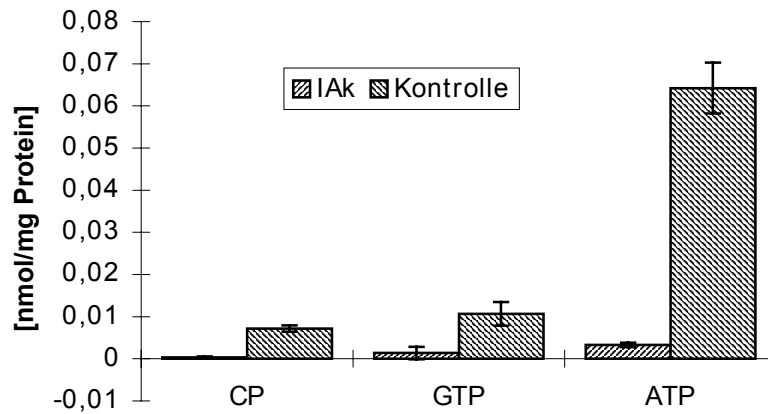


Diagramm 22: Die nach der Inkubation noch in den Zellen enthaltenen energiereichen Phosphate CP, GTP und ATP. Nach der Inkubation mit IAk sinken sie nahezu auf Null.

3.3.4. Trypanblauausschlussmethode

Bei der Trypanblauausschlussmethode färben sich einige abgerundete Zellen schon in der Kontrollgruppe blau an. Dabei handelt es sich aber vermutlich um avitale, obenaufliegende Zellen, die nicht zum Monolayer gehören. Die Boden anhaftenden Zellen sind nicht gefärbt. Auch nach Inkubation mit PNAk sind die meisten der am Boden anhaftenden Zellen nicht angefärbt, was für vitale Zellen mit intakter Zellmembran spricht. Nach der Inkubation mit IAk sind nahezu alle Zellen körnig angefärbt. Außerdem fällt die deutlich höhere Zahl avitaler abgerundeter Zellen auf. Wie die Ergebnisse der anderen Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität deutet auch dieser Versuch auf eine deutlich stärkere Schädigung der Zellen durch IAk im Vergleich zu PNAk hin.

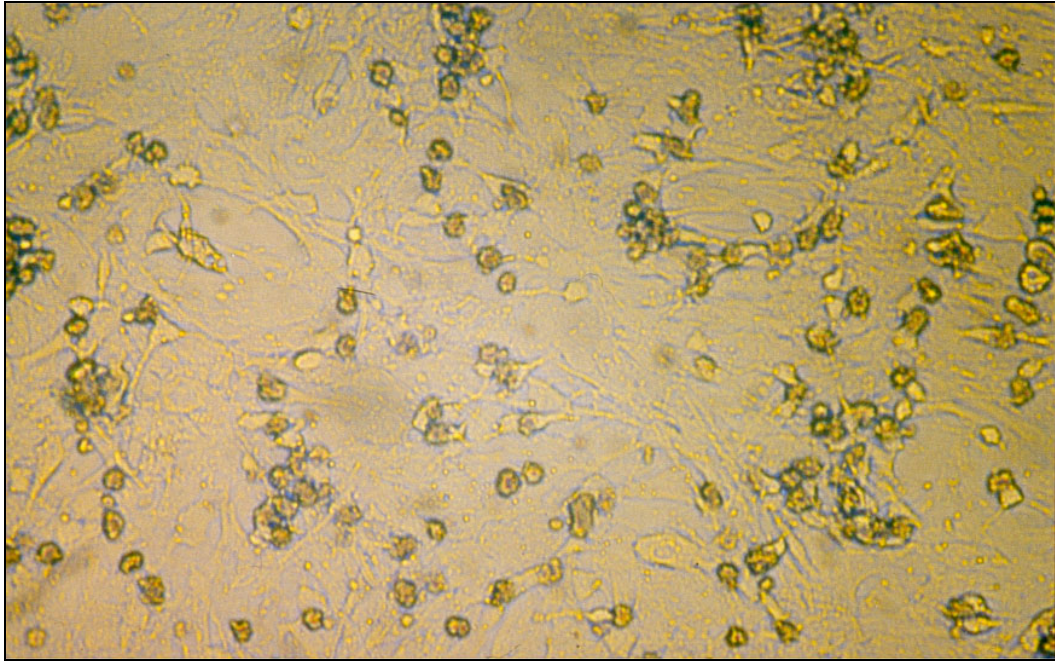


Abbildung 5: Kontrollzellen nach der Einfärbung mit Trypanblau

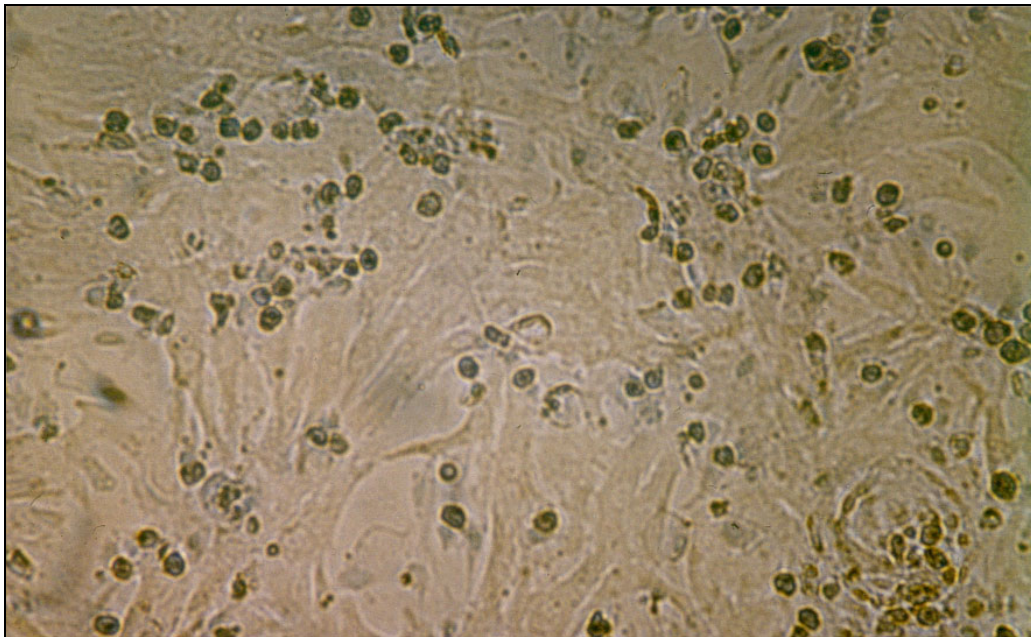


Abbildung 6: Mit Trypanblau eingefärbte Zellen nach Inkubation mit PNAk.

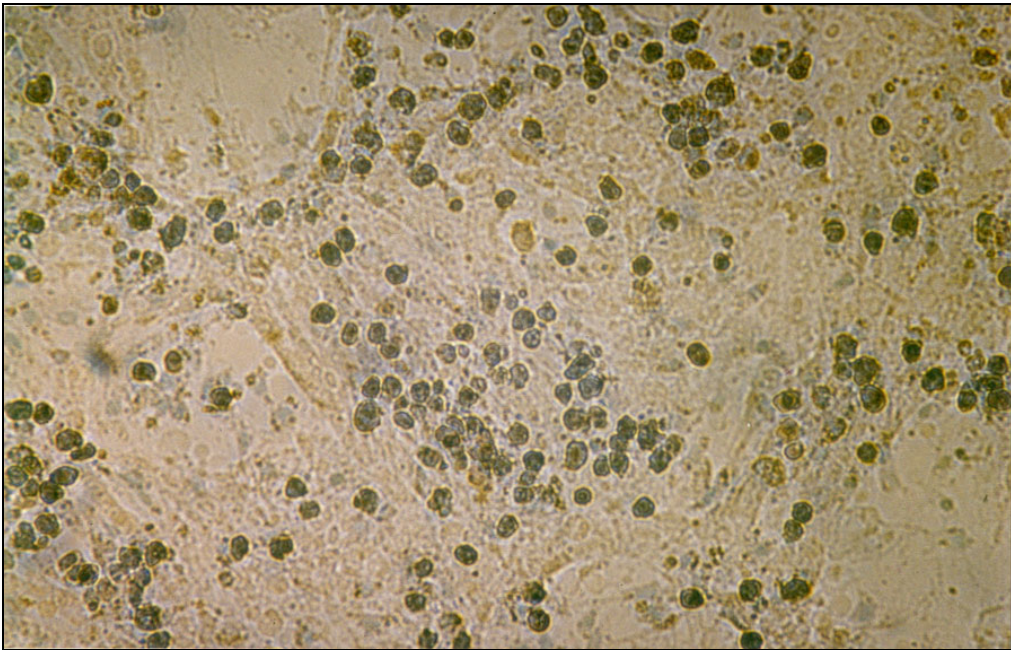


Abbildung 7: Mit Trypanblau eingefärbte Zellen nach Inkubation mit IAK.

3.3.5. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden dankenswerterweise durch Herrn Prof. Dr. Müller-Höcker vom Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

In den Kontrollen zeigt sich, wie nicht anders zu erwarten, eine regelhafte Feinstruktur der Kulturzellen.

Im Gegensatz dazu sind die Kardiomyozyten nach der Inkubation mit induzierten Antikörpern (K-RHS) stark degenerativ verändert und die Mitochondrien sind geschwollen, die Matrixgranula großteils verschwunden. Des weiteren sind ein deutliches intrazelluläres Ödem und eine Degeneration von Myofibrillen zu sehen.

Die Inkubation mit PNAk hingegen hat keine so starken Auswirkungen auf die Zellen. In den entsprechenden Fläschchen finden sich intakte Zellen, allerdings liegt auch hier ein intrazelluläres Ödem vor. Die Mitochondrien sind intakt, auch die Matrixgranula sind im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Eine Degeneration der Myofibrillen ist nicht zu beobachten.

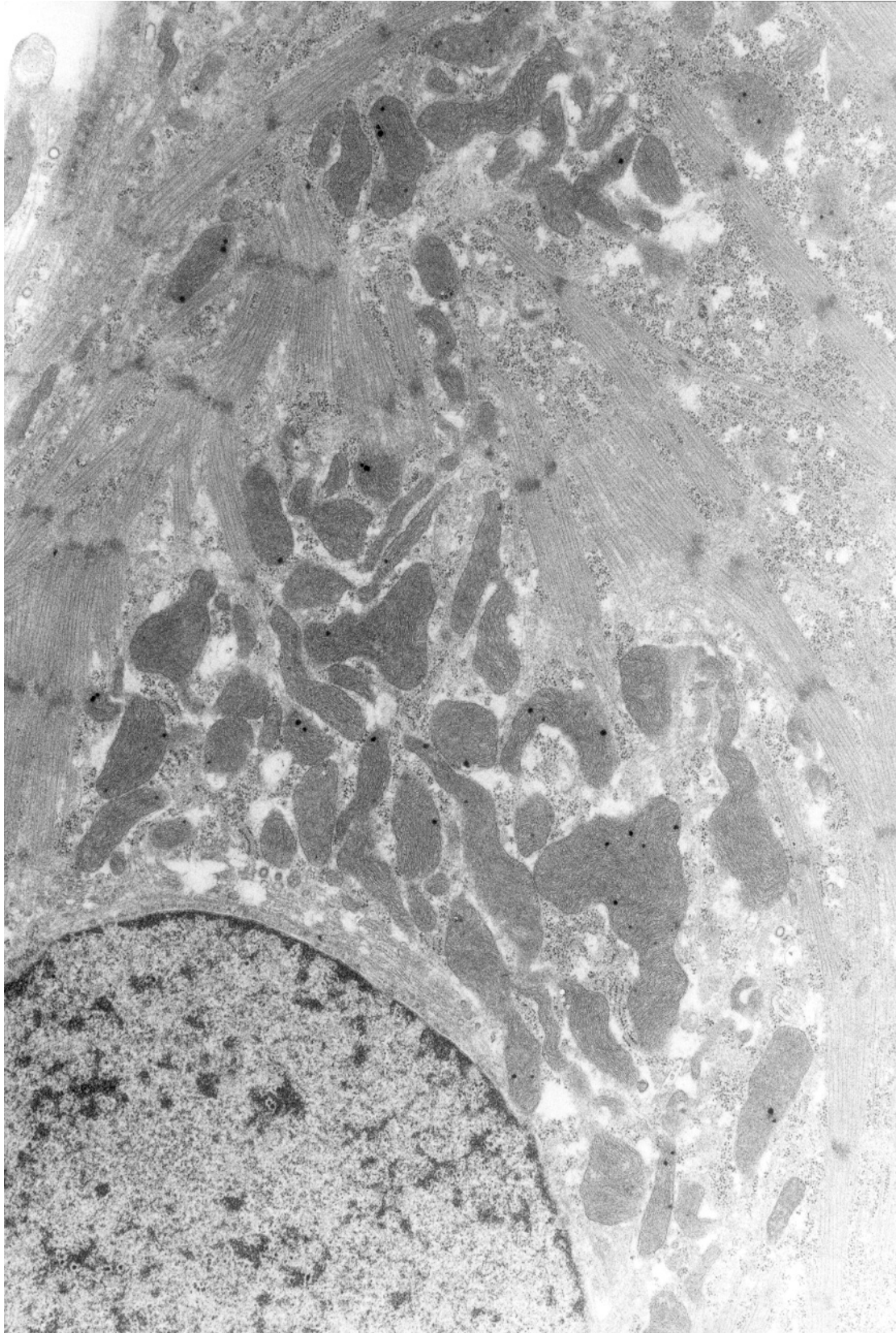


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 18500fach) der HMZ nach zwei-stündiger Inkubation mit SM (Kontrolle). Am unteren Bildrand ist ein Zellkern angeschnitten. Man erkennt deutlich die Mitochondrien mit den Christae und Matrixgranula.

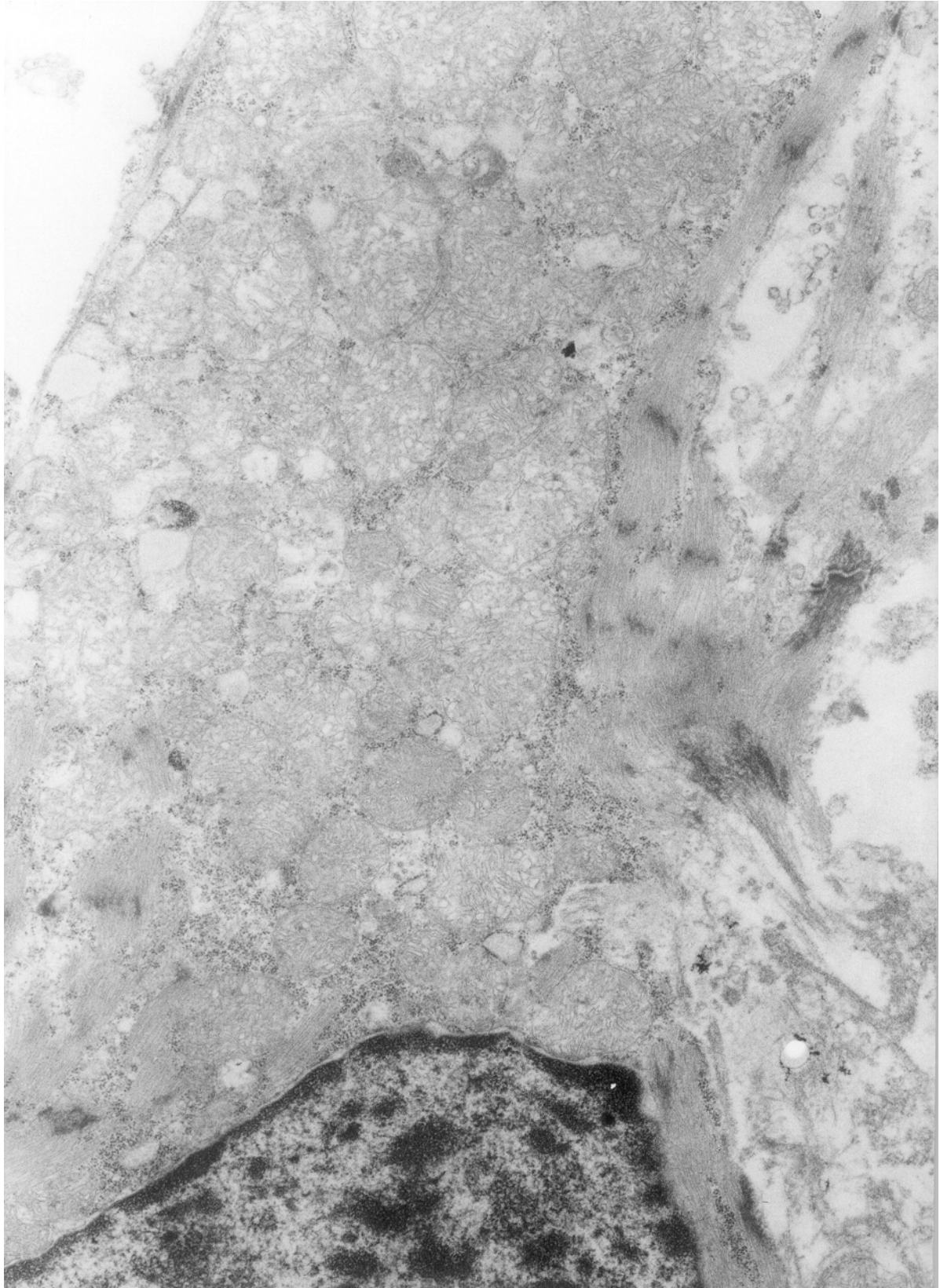


Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme (Vergr. 21000fach) der HMZ nach zweistündiger Inkubation mit K-RHS (IAk). Am unteren Bildrand sieht man einen Zellkern. Die Mitochondrien sind deutlich geschwollen und enthalten keine Matrixgranula.

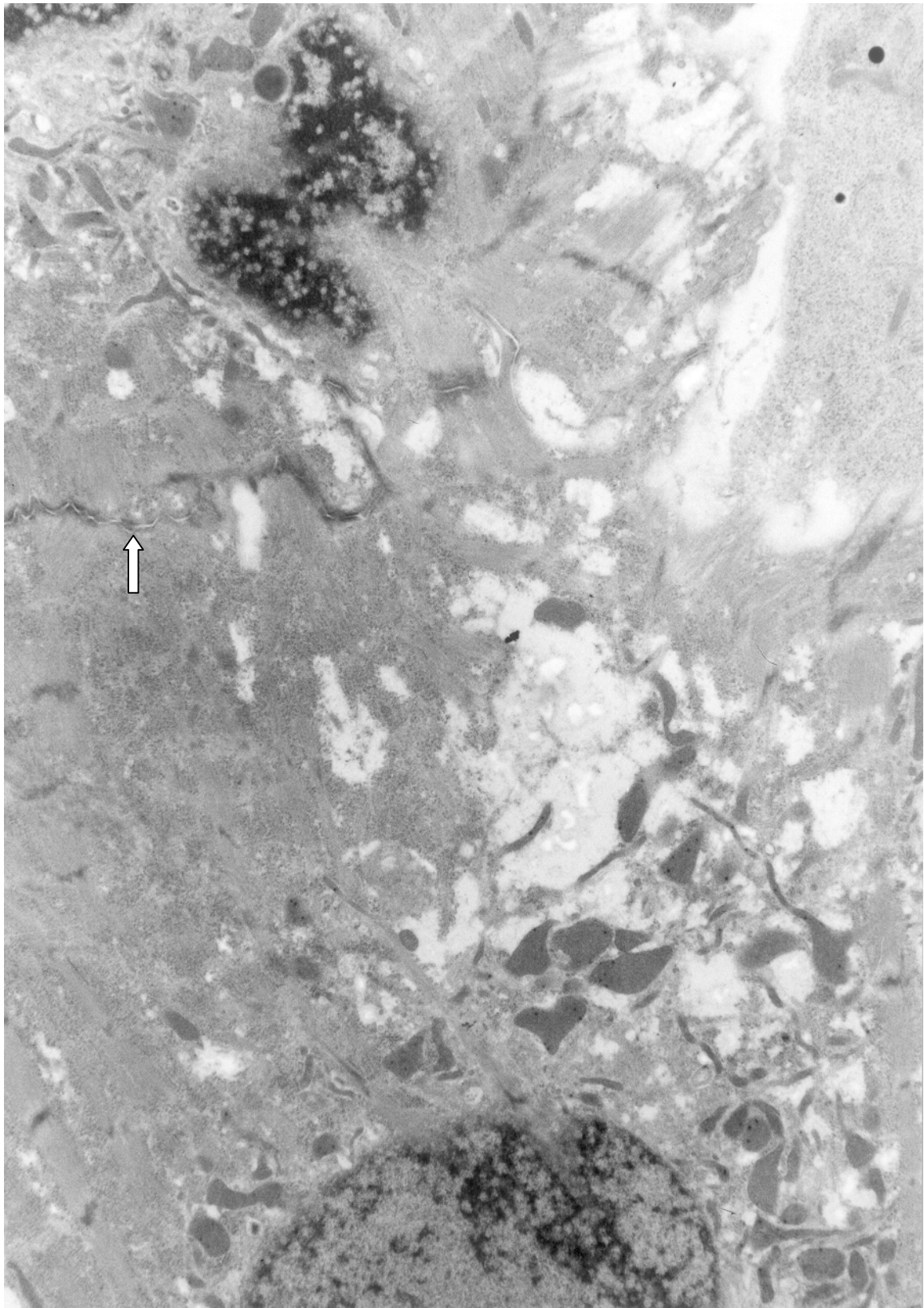


Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Aufnahme der HMZ (10000fache Vergr.) nach zweistündiger Inkubation mit xenogenem Serum (PNAk). In dieser kleineren Vergrößerungsstufe sieht man im unteren Bildbereich wieder den Zellkern, der Pfeil markiert einen Glanzstreifen.

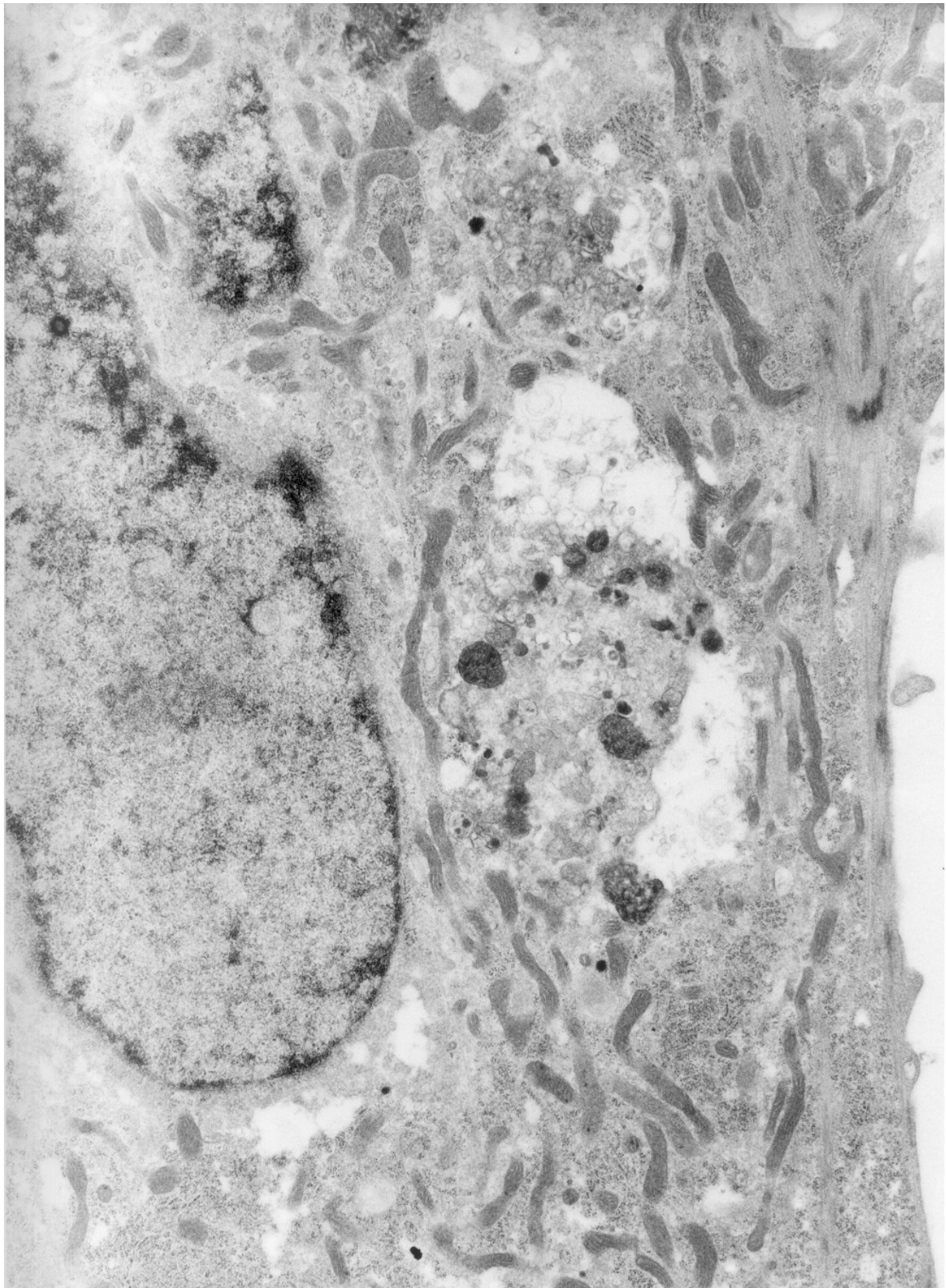


Abbildung 11: HMZ in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme (Vergr. 18480fach) nach Inkubation mit PNAk. Die fokale Zytoplasmonekrose (Pfeil) kann nicht auf die Antikörpereinwirkung zurückgeführt werden, solche Veränderungen finden sich auch in Kontrollkulturen. Die Umgebung der Nekrose entspricht dem Bild, das man auch in der Kontrolle (Abb.8) sieht.

3.4. Einfluss der PNAk bei Inkubation bis zu 24 Stunden

3.4.1. Chronischer Effekt von xenogenem Serum auf die Frequenz

Es ist bekannt, dass es kurz nach Zugabe von xenogenem Serum zu den spontan schlagenden Kardiomyozyten zu einem Frequenzanstieg und unmittelbar darauf zu einem reversiblen Stillstand kommt (Klein D., 1994). Bei diesen Versuchen fiel auch auf, dass die Zellen, nachdem sie erneut zu schlagen begonnen haben, sich asynchron kontrahieren. Offen blieb die Frage, ob die PNAk einen länger dauernden Einfluss auf das Schlagverhalten haben. Dauert die elektrische Dysfunktion der HMZ nach Zugabe von xenogenem Serum bzw. nach Xenotransplantation nur wenige Minuten und ist damit gut überbrückbar, oder kommt es zu länger dauernden Störungen des Kontraktionsverhaltens, die eine erfolgreiche Xenotransplantation dann gefährden würden?

Wie in 2.6.1. beschrieben, werden die Frequenzen der Zellen unter der Inkubation mit xenogenem Serum bestimmt. Das xenogene Serum wird 1:2 mit synthetischem Medium verdünnt. Die Auswirkungen des xenogenen Serums auf die Kontraktionsfrequenz der spontan schlagenden HMZ bis zu einer Beobachtungsdauer von 24 Stunden sind in Tabelle 13 und Diagramm 23 dargestellt. Die relativ großen Standardabweichungen sind auf Ergebnisse von unterschiedlichen Versuchstagen und damit auch unterschiedliche Zellpopulationen zurückzuführen. Hierdurch kommt es zu z.T. erheblichen Abweichungen auch schon der Ausgangsfrequenzen untereinander. Es fällt auf, dass die Standardabweichung der Kontraktionsfrequenz derjenigen Zellen, die mit xenogenem Serum inkubiert wurden, zu jedem Zeitpunkt größer ist als diejenigen der Kontrollgruppe. Es zeigt sich keine wesentliche Änderung der mittleren Kontraktionsfrequenz der HMZ bei länger dauernder Inkubation mit dem xenogenen Serum im Vergleich zur Kontrolle.

<i>T</i>	<i>Anzahl</i>	Kontrolle		XS	
		<i>MW</i>	<i>SD</i>	<i>MW</i>	<i>SD</i>
0 h	110	28	7	30	7
2 h	80	27	7	30	8
4 h	80	29	7	32	11
6 h	80	29	9	32	11
8 h	80	28	9	31	11
10 h	80	27	9	29	12
12 h	110	27	8	27	13
14 h	55	31	8	29	14
16 h	55	31	9	30	14
18 h	55	32	9	30	15
20 h	55	32	11	27	15
22 h	55	33	12	33	15
24 h	55	33	11	34	12

Tabelle 13: Die Frequenzen [Schläge/10s] und die zugehörigen Standardabweichungen der HMZ im Gesichtsfeld zu den Zeitpunkten $t=0h$ (vor Zugabe) und bis zu 24 h danach für die Inkubation mit SM (Kontrolle) und xenogenem Serum (XS). In der zweiten Spalte von links ist die jeweilige Anzahl der beobachteten Zellen pro Zeitpunkt aufgeführt.

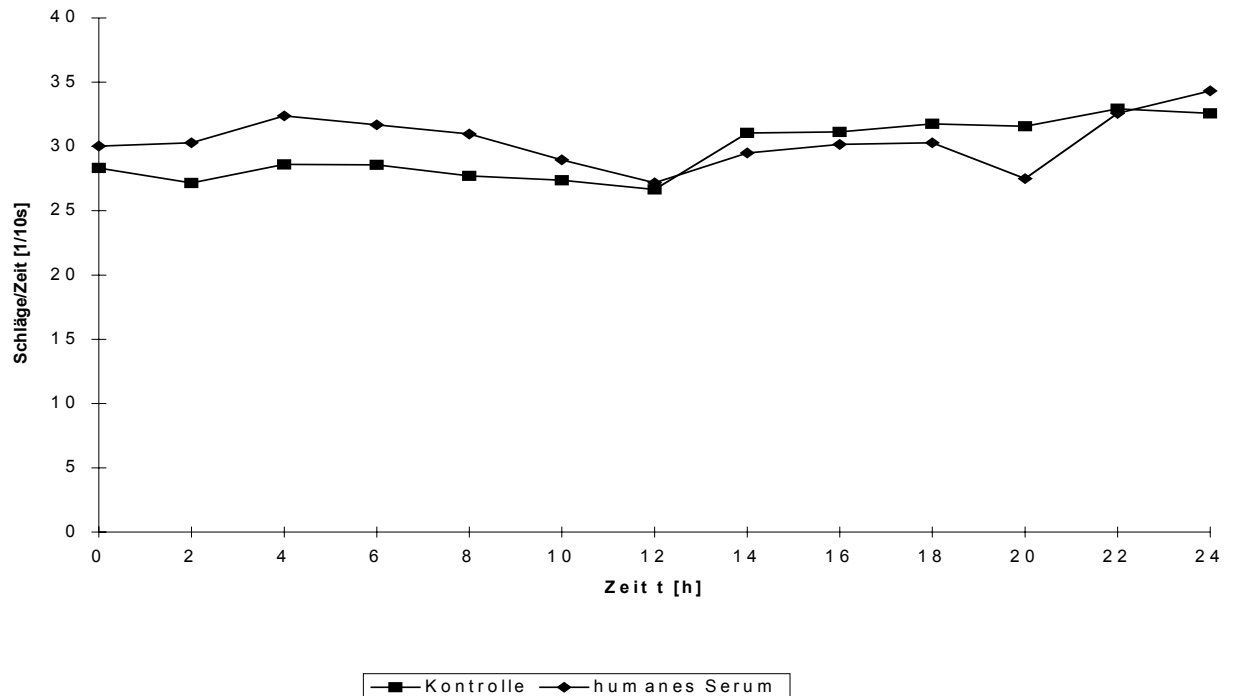


Diagramm 23: Graphische Darstellung der Kontraktionsfrequenzen von in den Gesichtsfeldern befindlichen HMZ bei Inkubation mit SM (Kontrolle) und humanem (xenogenem) Serum. Die Standardabweichungen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in das Diagramm eingetragen.

3.4.2. Chronischer Effekt von xenogenem Serum auf die Synchronizität des Schlagverhaltens

Um zu untersuchen, ob die Synchronizität des Schlagverhaltens durch die PNAk auch länger gestört wird als bis zu 20 min. nach Serumzugabe (Klein, 1994), werden die Varianzen der gemessenen Frequenzen verglichen. Hierzu dient die Varianzanalyse nach Hartley (Sachs, 1992), siehe hierzu 2.10.2.

Die sich ergebenden Werte für Kontroll- und Probengruppe sind mitsamt der jeweiligen Prüfgröße \hat{F}_{\max} in Tabelle 14 wiedergegeben. Für Werte, bei denen die Varianz der Probe signifikant größer ist als die der Kontrollgruppe, sind die Felder gepunktet.

<i>T</i>	<i>Anzahl</i>	Varianz		Prüfgröße
		<i>Kontrolle</i>	<i>Probe</i>	
0 h	110	44	50	1,1
2 h	80	50	60	1,2
4 h	80	50	120	2,4
6 h	80	82	119	1,4
8 h	80	76	129	1,7
10 h	80	75	153	2,0
12 h	110	64	174	2,7
14 h	55	70	188	2,7
16 h	55	73	208	2,9
18 h	55	81	236	2,9
20 h	55	131	229	1,8
22 h	55	152	226	1,5
24 h	55	129	135	1,0

Tabelle 14: Die Varianzen der Langzeitinkubation von HMZ über 24 Stunden mit SM (Kontrolle) und xenogenem Serum im Vergleich. Die letzte Spalte enthält die Prüfgröße für die Varianzanalyse nach Hartley. Gepunktete Felder bedeuten, dass die Varianz der Probengruppe (XS) signifikant größer ist als die der Kontrolle ($p=0,01$).

Die Varianzen der Langzeitinkubation sind schon vor Serumzugabe signifikant unterschiedlich. Eine deutliche Zunahme des Varianzunterschiedes im Laufe des Versuches fällt auf. Auch hier bedingen unterschiedliche Zellpopulationen an verschiedenen Tagen die relativ großen Varianzen zu Beginn des Versuches.

In Tabelle 15 sind die Varianzen und Prüfgrößen für Versuche angegeben, bei denen im Vergleich zu xenogenem Serum (XS) und der Mediumkontrolle (SM) Serumaliquots nach

Hitzeinaktivierung des Komplementsystems und Antikörperabsorption (XSIA) eingesetzt wurden. Mittels der Varianzanalyse nach Hartley werden die Kontrolle gegen XS bzw. XSIA und die beiden Serumgruppen gegeneinander getestet.

<i>T</i>	<i>Anzahl</i>	Varianzen			Prüfgrößen		
		<i>XSIA</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>XS</i>	<i>K-XSIA</i>	<i>K-XS</i>	<i>XSIA-XS</i>
0h	50	41	19	26	2,1	1,4	1,5
2h	50	10	16	72	1,6	4,5	7,1
4h	50	25	10	186	2,6	19,3	7,4
6h	50	18	12	161	1,4	13,1	9,1
8h	50	45	18	167	2,4	9,0	3,7
10h	50	49	15	201	3,3	13,5	4,1
12h	50	44	16	216	2,8	13,7	4,9
14h	20	37	7	163	5,2	22,7	4,4
16h	20	40	12	171	3,4	14,3	4,2
18h	20	41	17	92	2,4	5,3	2,2
20h	20	57	61	129	1,1	2,1	2,3
22h	20	50	38	60	1,3	1,6	1,2
24h	20	22	101	49	4,6	2,1	2,2

Tabelle 15: Die Varianzen und Prüfgrößen für die Varianzanalyse nach Hartley ($p=0,01$). Geprüft wurde xenogenes Serum (XS) sowie inaktiviertes und absorbiertes Serum (XSIA) jeweils gegen eine Kontrollgruppe (SM). Vertikal gestreifte Felder bedeuten, dass die Varianz der Serumgruppe signifikant höher ist als die der Kontrolle, in dem horizontal gestreiften ist es umgekehrt; wenn das Prüfgrößenfeld einen weißen Hintergrund besitzt, zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Varianzen. In der letzten Spalte zeigen gestreifte Felder an, dass die Varianz unter XS signifikant größer ist als unter XSIA.

Vor Zugabe des Serums ($t=0h$) sind die Varianzen der einzelnen Gruppen gleich. Ab dem ersten Messpunkt ($t=2h$) bis einschließlich des Zeitpunktes $t=18h$ sind die Varianzen in der Gruppe XS signifikant ($p<0,01$) größer als die der Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt $t=24h$ ist hingegen die Varianz der Frequenzen der Kontrollgruppe größer als die der anderen Gruppen.

Für die Zeitpunkte $t=2h$ bis einschließlich $t=16h$ sind außerdem die Frequenzvarianzen der Gruppe XS signifikant ($p<0,01$) größer als die der Gruppe XSIA.

Dies bedeutet, dass das xenogene Serum die Varianz der Frequenzen zu einem bestimmten Zeitpunkt vergrößert, also zu einer Dissoziation der Zellkontraktionen führt. Diese bewirkt, dass verschiedene Zellen im gleichen Well in unterschiedlichem Rhythmus schlagen, der Monolayer also nicht mehr als synchron schlagendes funktionelles Synzytium funktioniert. Eine Hitzeinaktivierung des Komplementsystems und Absorption der Antikörper dieses Serums hebt diesen Effekt teilweise auf.

Die Tatsache, dass gegen Ende der 24-stündigen Inkubation die Varianzen der Gruppe XS nicht mehr signifikant größer sind als die der anderen beiden Gruppen, beruht zum Teil auf einer steigenden Frequenzvarianz der letzteren. Andererseits nimmt die Dissoziation der Kontraktionen der mit XS inkubierten Seren im Laufe der Zeit ab, was Hinweis auf einen extrazellulär proteolytischen Abbau der Antikörper in der Zellkultur sein könnte.

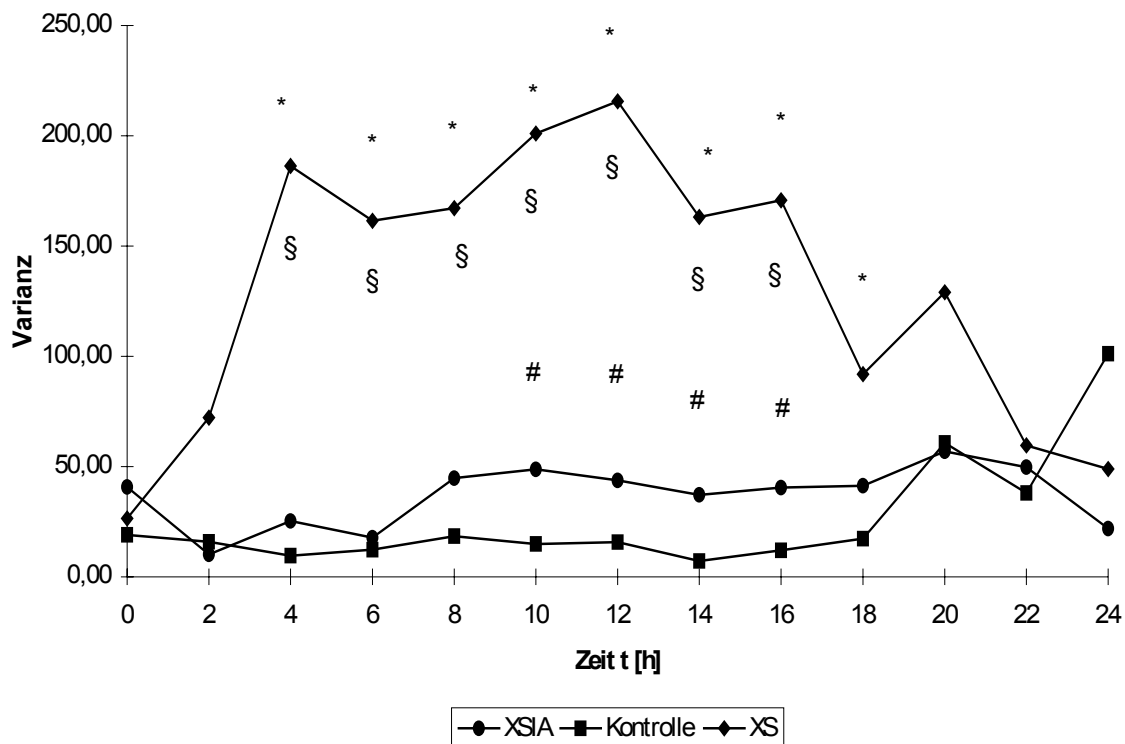


Diagramm 24: Die Varianzen aus Tabelle 18 in einer graphischen Darstellung.

*: Signifikanter Varianzunterschied zwischen Kontrolle und XS;

§: Signifikanter Varianzunterschied zwischen XSIA und XS;

#: Signifikanter Varianzunterschied zwischen Kontrolle und XSIA.

Auch eine Testung auf Gleichheit der Standardabweichungen mittels eines U-Tests für unverbundene Stichproben (Mann-Whitney, nach Sachs 1992) ergibt eine Dissoziation des Schlagverhaltens durch das xenogene Serum für die getesteten Zeitpunkte 2 h bis 12 h. Zum Ausgangszeitpunkt $t = 0$ h ist eine solche Dissoziation nicht nachweisbar. Der Mann-Whitney-Test ist ein Rangzahlen-Test, er wird für die Standardabweichungen der Frequenzen in den fünf Gesichtsfeldern pro Well durchgeführt. Die kritischen Werte U_{krit} sind in diesem Fall 37 (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$) und 31 ($\alpha = 0,02$).

In Tabelle 16 sind diese Ergebnisse für den Zeitraum von $t=0\text{h}$ bis einschließlich $t=12\text{h}$ dargestellt. Außer zum Zeitpunkt $t = 0\text{ h}$ ist die Standardabweichung der Serumgruppe (XS) jeweils signifikant größer als die der Kontrolle ($p=0,02$). Nur zum Zeitpunkt $t = 8\text{ h}$ ist die Irrtumswahrscheinlichkeit größer ($p = 0,05$).

Zeitpunkt t	$U_{\text{Kontr.}}$	U_{XS}	
0 h	64,5	79,5	Annahme von H_0
2 h	119	25	Ablehnung von H_0 ($\alpha=0,02$)
4 h	140	4	Ablehnung von H_0 ($\alpha=0,02$)
6 h	134,5	9,5	Ablehnung von H_0 ($\alpha=0,02$)
8 h	111	33	Ablehnung von H_0 ($\alpha=0,05$)
10 h	117,5	26,5	Ablehnung von H_0 ($\alpha=0,02$)
12 h	139	5	Ablehnung von H_0 ($\alpha=0,02$)

Tabelle 16: Die Ergebnisse des Mann-Whitney-Tests. Die Nullhypothese (H_0) besagt, dass die miteinander verglichenen Standardabweichungen gleich sind.

Eine weitere Möglichkeit der Darstellung der Streuung in einer Gruppe stellt der Variationskoeffizient dar (siehe 2.10.4.).

In Tabelle 17 und Tabelle 18 sind die Variationskoeffizienten für die gleichen Versuche dargestellt, deren Varianzen sich in Tabelle 14 bzw. Tabelle 15 finden.

<i>T</i>	<i>Anzahl</i>	Variationskoeff.	
		<i>Kontrolle</i>	<i>XS</i>
0 h	110	23,38	23,44
2 h	80	26,10	25,53
4 h	80	24,75	33,87
6 h	80	31,72	34,40
8 h	80	31,41	36,71
10 h	80	31,72	42,74
12 h	110	29,91	48,48
14 h	55	26,98	46,47
16 h	55	27,41	47,80
18 h	55	28,26	50,70
20 h	55	36,20	55,01
22 h	55	37,49	46,18
24 h	55	34,82	33,83

Tabelle 17: Die Variationskoeffizienten für der Frequenzen für XS und Kontrolle im Vergleich. Es handelt dich um die gleichen Frequenzen wie in Tabelle 14.

<i>T</i>	<i>Anzahl</i>	Variationskoeffizienten		
		<i>XSIA</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>XS</i>
0 h	50	19,70	13,53	14,74
2 h	50	10,54	12,51	27,62
4 h	50	16,02	9,26	42,34
6 h	50	12,75	9,99	39,91
8 h	50	22,82	12,87	42,70
10 h	50	26,26	11,55	47,04
12 h	50	26,31	11,85	45,46
14 h	20	32,65	6,56	32,72
16 h	20	35,81	8,32	32,58
18 h	20	34,55	9,80	23,40
20 h	20	38,06	17,51	27,10
22 h	20	68,44	13,28	17,64
24 h	20	72,45	23,42	16,14

Tabelle 18: Die Variationskoeffizienten der Frequenzen für die Langzeitinkubation mit XSIA, XS und einer Kontrolle (SM) (gleiche Versuche wie in Tabelle 15)

Das Diagramm 25 enthält Scatterdiagramme $t=0h$ sowie $t=4h$ und $t=12h$. Hierbei findet sich auf der X-Achse jedes Diagramms die Messpunktnummer, auf der Y-Achse die Frequenz in Schlägen pro zehn Sekunden. Jeder Punkt stellt eine Frequenzmessung dar, die fünf Messungen für ein Well befinden sich jeweils direkt hintereinander.

Die Messpunkte für XSIA und Kontrolle liegen jeweils auf einer Linie. Das heißt, die Frequenzen sind gleich. Daraus lässt sich ableiten, dass sich die Zellen des Monolayers synchron kontrahieren. Im Vergleich dazu kommt es unter dem Einfluss des xenogenen Serums zu einer Aufsplittung der Frequenzen. Die Messpunkte für ein Well liegen nicht mehr auf einer Linie.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das xenogene Serum zu einer Dysfunktion der Zellen führt. Diese äußert sich in einer Frequenzsteigerung unmittelbar nach Serumzugabe und in einem reversiblen Stillstand kurz danach. Über längere Zeit hinweg kommt es zu einer Dissoziation der Zellen des spontan schlagenden Monolayers. Diese Dissoziation setzt unmittelbar nach Serumzugabe ein und hält für mindestens 18 Stunden an. Durch Hitzeinaktivierung des Komplementsystems und Absorption der Antikörper lässt sich diese Wirkung stark abschwächen.

Kontrolle

XS

XSIA

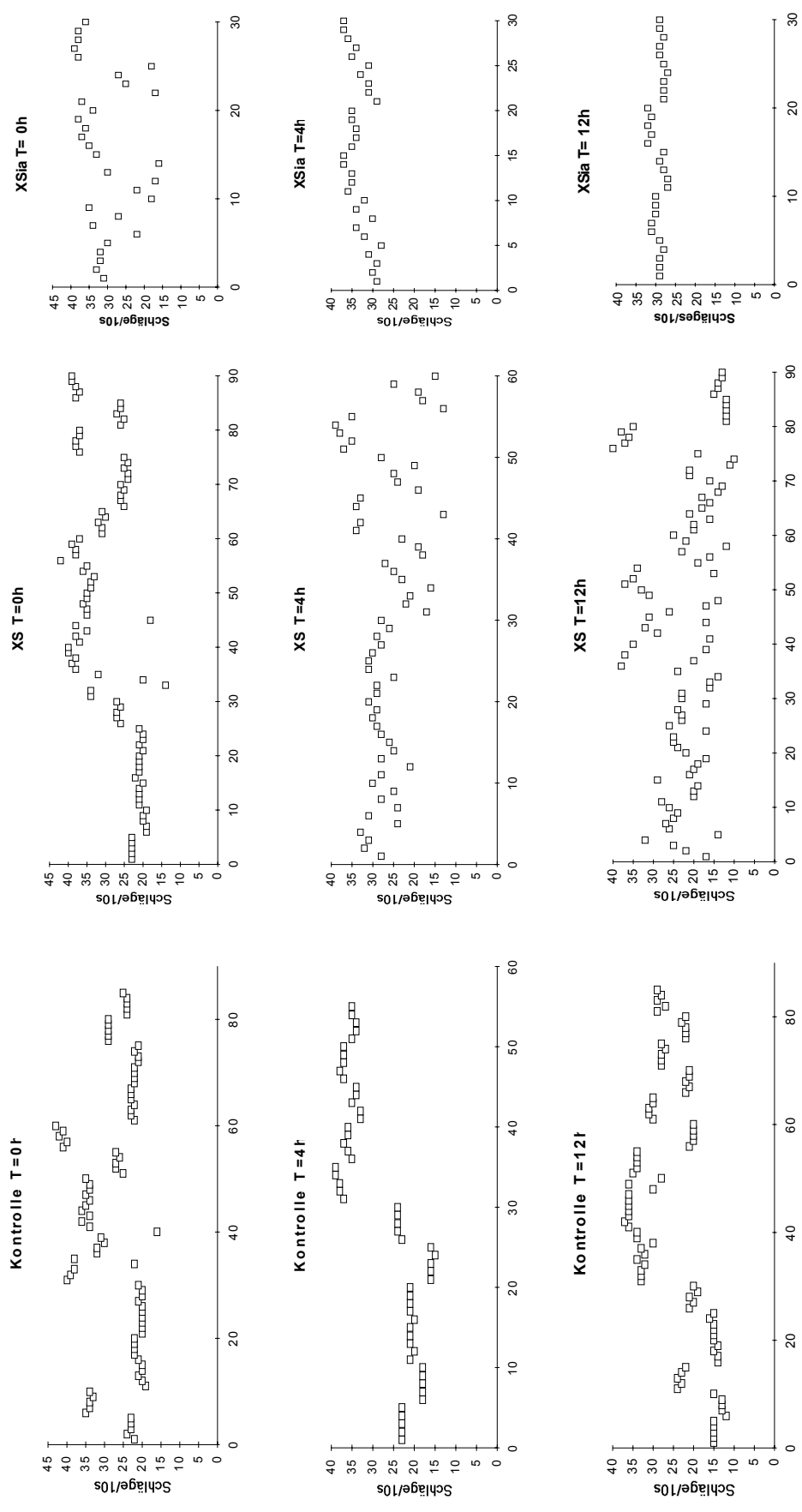


Diagramm 25: Scatterdiagramme für die Messungen der Frequenzen zu den Zeitpunkten $t = 0$ h, 4 h und 12 h. Es ist deutlich zu sehen, dass das XS eine Inhomogenität der Frequenzen bewirkt.

3.4.3. Konzentrationsabhängigkeit des dissoziierenden Effekts der PNAk

Da es sich bei der Dissoziation um einen Effekt des Serums bzw. der in ihm enthaltenen PNAk auf die HMZ handelt, stellt sich die Frage, ob die Dissoziation abhängig von der Serumkonzentration ist.

Um dies zu klären, wird das xenogene Serum in Stufen von 1:2 bis 1:32 verdünnt. Die Zellen werden für 24 Stunden mit der jeweiligen Serum-SM-Mischung inkubiert. Vor Zugabe der Seren und zum Zeitpunkt $t = 24 \text{ h}$ werden die Frequenzen mit Mittelwerten, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten bestimmt (Tabelle 19 und Diagramm 26).

	Mittelwert	SD	VK
	vor Zugabe		
Ko	33,87	1,06	3,13
1:2	34,47	3,14	9,10
1:4	37,27	1,16	3,12
1:8	33,93	0,96	2,83
1:16	33,73	2,60	7,72
1:32	34,00	1,96	5,78
	nach 24 h		
Ko	16,80	5,75	34,21
1:2	9,00	9,39	104,32
1:4	27,53	17,76	64,50
1:8	52,73	6,54	12,40
1:16	39,47	11,11	28,15
1:32	32,33	12,29	38,00

Tabelle 19: Die Mittelwerte, Standardabweichungen(SD) und Variationskoeffizienten (VK) der Frequenzen, mit denen die HMZ unter Inkubation mit verschiedenen Verdünnungen des XS schlagen ($n = 15$, das heißt je drei Wells, 5 Gesichtsfelder pro Well).

Wie auch bei anderen Versuchen zu beobachten ist, kommt es nach 24-stündiger Inkubation unter dem Einfluss von XS zu einer elektrischen Dissoziation der HMZ, aber ebenfalls zu einem Anstieg des Variationskoeffizienten der Kontrollgruppe. Zu diesem Zeitpunkt sind die Auswirkungen der elektrischen Dissoziation des Zellmonolayers unter XS wiederum deutlich zu erkennen. Es kommt zur Zunahme des Variationskoeffizienten. Für die Serumverdünnungen 1:2 und 1:4 ist dies aus Tabelle 19 und Diagramm 27 ersichtlich. Die höheren Verdünnungen verursachen keine elektrische Dissoziation der Zellen.

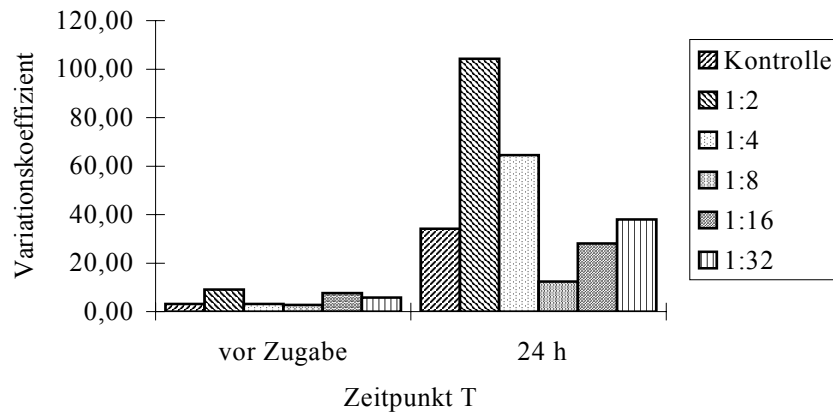


Diagramm 26: Graphische Darstellung der Variationskoeffizienten der Frequenzen für die 24stündige Inkubation der Zellen mit verschiedenen Verdünnungen von XS.

3.4.4. Einfluss verschiedener Serumaufbereitungen der PNAk auf die Frequenz

Um herauszufinden, welche Bestandteile des xenogenen Serums die elektrophysiologischen Eigenschaften der HMZ beeinflussen, so dass sie nicht mehr als synchroner Monolayer schlagen, werden die Zellen mit verschiedenen Serumpräparationen inkubiert. Dies sind

- xenogenes Serum (XS),
- xenogenes Serum (XSa), aus dem die Antikörper absorbiert wurden (siehe 2.2.5),
- xenogenes Serum (XSi), dessen Komplementsystem hitzeinaktiviert wurde (siehe 2.2.6.) und
- synthetisches Medium (SM) als Kontrollgruppe.

Die Zellen werden für sechs Stunden mit dem jeweiligen Serum inkubiert. Die Frequenz wird vor Serumzugabe ($t = 0$) und zwei, vier und sechs Stunden danach gemessen (Versuchsaufbau siehe 2.6.1.). Die Versuche werden an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt. Es wird zu jedem Zeitpunkt und für jede Gruppe die in Tabelle 22 angegebene Zellzahl ausgewertet.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen für beide Versuchstage zusammengefasst finden sich in Tabelle 20 und Diagramm 27. Die Variationskoeffizienten aller Versuche sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Zeit t	Kontr.		XS		XSa		XSi	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
0 h	42,40	5,67	42,75	4,98	42,23	5,95	41,89	3,34
2 h	44,12	3,49	39,85	9,60	33,07	9,81	30,73	6,66
4 h	46,14	4,77	38,29	9,74	31,77	10,85	30,98	9,98
6 h	49,16	3,69	37,73	10,73	31,77	11,37	32,15	10,44

Tabelle 20: Die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Zellen in einer Tabelle zusammengefasst (n siehe Tab. 22).

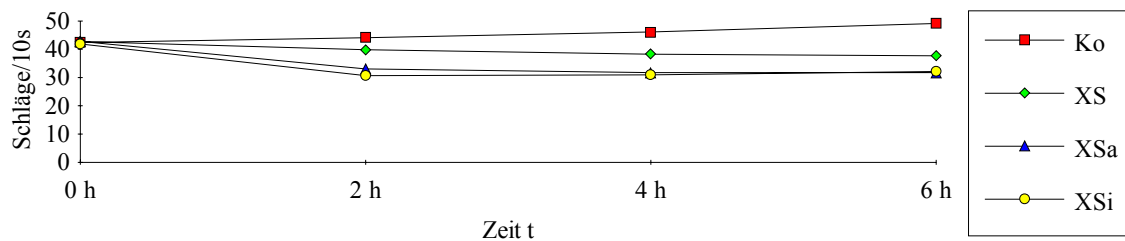


Diagramm 27: Die graphische Darstellung der Frequenzen für die sechsstündige Inkubation mit verschiedenen Aufbereitungen des xenogenen Serums.

Es kommt auch in diesem Versuch nicht zu nennenswerten Unterschieden in der Kontraktionsfrequenz der spontan schlagenden Zellen während der Inkubation mit verschiedenen Aufbereitungen des xenogenen Serums.

Zeit t	Variationskoeffizienten			
	Kontr.	XS	XSa	XSi
0 h	13,38	11,65	13,76	7,97
2 h	7,90	24,08	29,66	21,66
4 h	10,34	25,43	34,16	32,21
6 h	7,50	28,45	35,79	32,48

Tabelle 21: Die Variationskoeffizienten aller Versuche in einer Tabelle zusammengefasst (n siehe Tab.22).

	Ko	XS	Xsa	Xsi
Versuch 1	25	30	30	30
Versuch 2	25	25	30	25
gesamt	50	55	60	55

Tabelle 22: Die Anzahl der pro Zeitpunkt beobachteten Zellen für jede Gruppe und jeden Versuchstag getrennt aufgelistet.

Versuch 1								
	Kontr.		XS		XSa		XSi	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
0 h	37,72	4,34	38,87	3,19	36,93	3,57	39,40	2,14
2 h	41,08	1,75	35,17	9,24	23,63	0,93	25,63	1,54
4 h	41,92	1,91	31,77	4,83	21,10	0,96	22,43	2,14
6 h	47,12	1,13	31,77	5,53	20,83	0,91	22,97	2,03

Versuch 2								
	Kontr.		XS		XSa		XSi	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
0 h	47,08	1,08	47,40	1,44	47,53	1,11	44,88	1,56
2 h	47,16	1,57	45,48	6,60	42,50	3,28	36,84	5,05
4 h	50,36	2,40	46,12	8,26	42,43	1,79	41,24	4,20
6 h	51,20	4,22	44,88	11,16	42,70	3,85	43,16	2,94

Tabelle 23: Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Frequenzen für die verschiedenen Serumgruppen im Vergleich, getrennt nach Versuchstagen.

Versuch 1				
Zeit t	Variationskoeffizienten			
	Kontr.	XS	XSa	XSi
0 h	11,52	8,21	9,67	5,44
2 h	4,27	26,29	3,93	6,02
4 h	4,56	15,19	4,55	9,56
6 h	2,40	17,39	4,38	8,82

Versuch 2				
Zeit t	Variationskoeffizienten			
	Kontr.	XS	XSa	XSi
0 h	2,29	3,05	2,33	3,48
2 h	3,33	14,52	7,71	13,70
4 h	4,76	17,91	4,23	10,17
6 h	8,25	24,87	9,02	6,81

Tabelle 24: Die Variationskoeffizienten der Frequenzen für die verschiedenen Serumgruppen im Vergleich, getrennt nach Versuchstagen.

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse des Tests zur Prüfung der Gleichheit mehrerer Varianzen nach Cochran (siehe 2.10.5.).

Sowohl Absorption der Antikörper als auch Hitzeinaktivierung des Komplementsystems vermindern die zur Dissoziation führende Wirkung des xenogenen Serums bzw. heben sie auf. Dabei hat die Absorption der Antikörper einen stärkeren Einfluss als die reine Komplementinaktivierung. Dies ist neben den Tabellen auch anschaulich aus den Scatterdiagrammen (Diagramm 29) abzulesen.

Versuch 1			
Varianz			Prüfgröße
XS	XSa	XS _i	
10,19	12,75	4,59	0,41
85,45	0,86	2,38	0,93
23,29	0,92	4,60	0,72
30,53	0,83	4,10	0,83
Versuch 2			
Varianz			Prüfgröße
XS	XSa	XS _i	
2,08	1,22	2,44	0,30
43,59	10,74	25,47	0,53
68,19	3,22	17,61	0,72
124,61	14,84	8,64	0,75

Tabelle 25: Die Varianzen der Frequenz aller Versuche in einer Tabelle. Gepunktet unterlegte Felder enthalten signifikant ($p=0,01$) unterschiedliche Varianzen (Testung nach Cochran, s. 2.10.5).

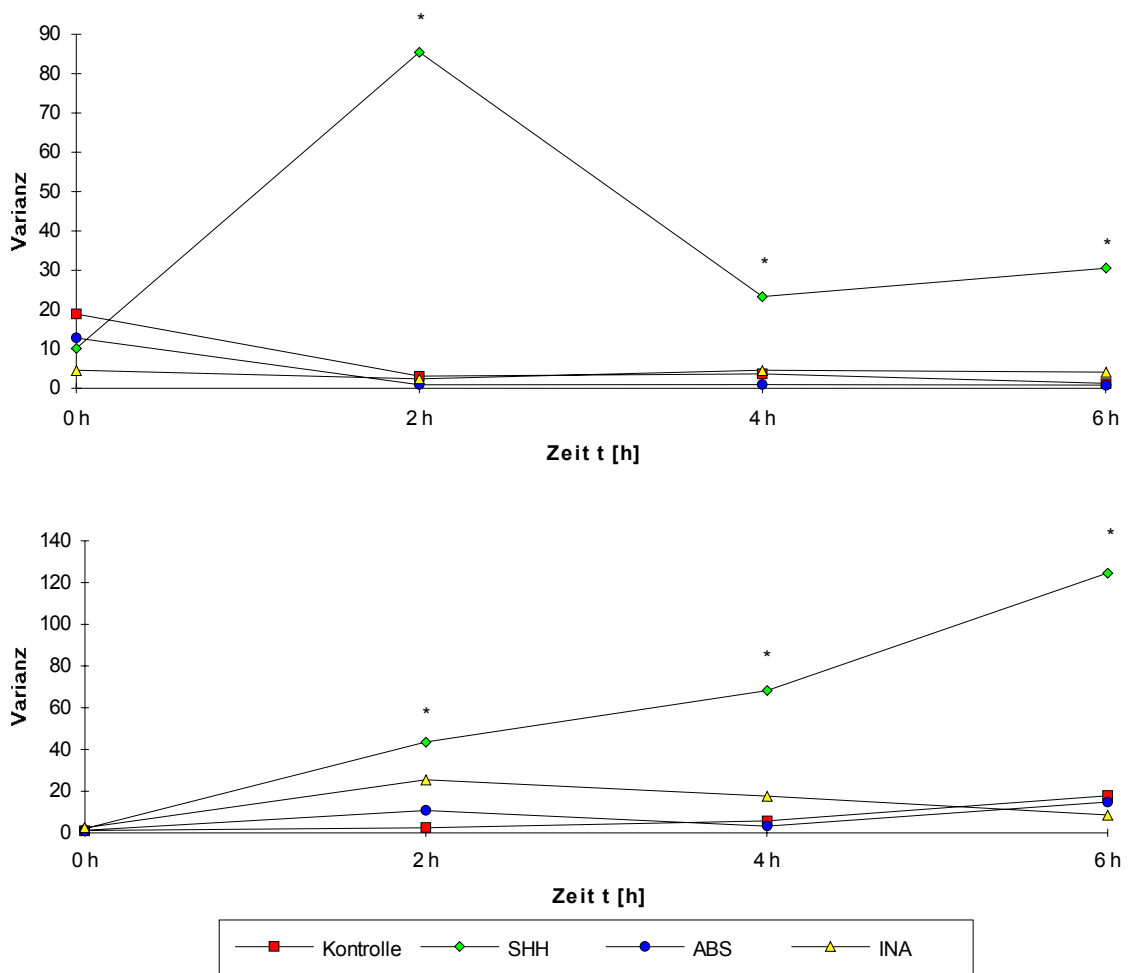


Diagramm 28: Die Frequenzvarianzen der einzelnen Versuche. * markiert einen signifikanten Unterschied ($p=0,01$).

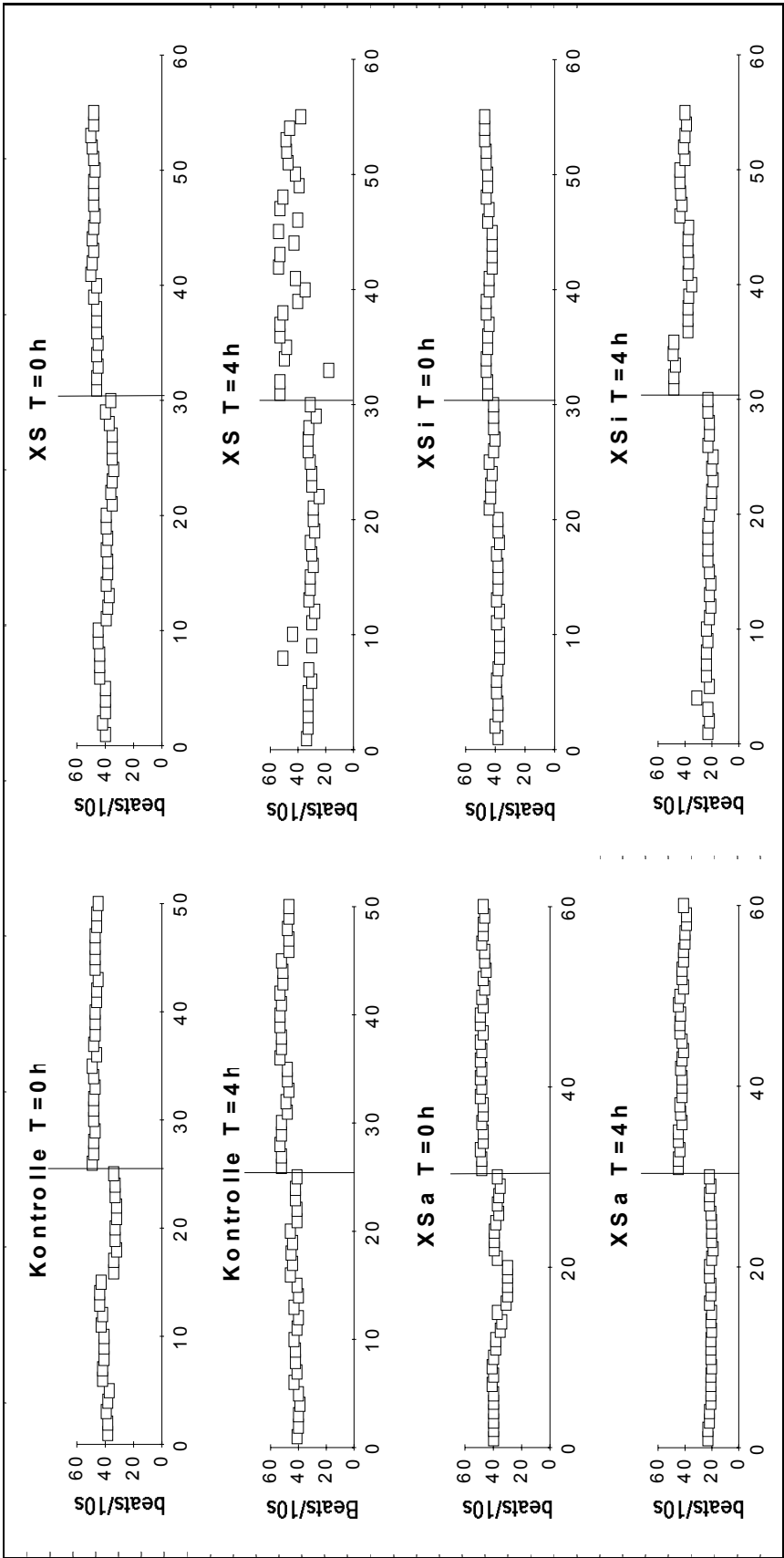


Diagramm 29: Die Daten aus Tab. 26 in Scatterdiagrammen dargestellt. Jeder Punkt entspricht einer Frequenzmessung über 10 s. Während zum Zeitpunkt $t=0h$ alle Punkte auf einer Linie liegen, ist dies zum Zeitpunkt $t=4h$ unter der Inkubation mit XS nicht der Fall.

3.5. Einfluss der PNAk auf den Stickoxidstoffwechsel

3.5.1. Die Stickoxidproduktion in Abhängigkeit von der Zeit

Die 1:1-Mischung aus XS und SM enthält bereits vor Inkubation deutlich mehr Nitrit als das reine SM, und zwar in einer Konzentration von 10,88 μM versus 3,73 μM . Dies entspricht in etwa dem Verhältnis, das die Nitritwerte bis zu einem Zeitpunkt von sechs Stunden aufweisen. Die Ausgangswerte können in der vorliegenden Darstellung nicht mit aufgenommen werden, da sie nicht aus dem Überstand inkubierter Zellen stammen und deshalb auch nicht auf die zelluläre Proteinmenge bezogen werden können. Im Laufe der Zeit steigt die Stickoxidproduktion der Zellen, die mit XS inkubiert werden, im Vergleich zur Kontrolle an. Zum letzten Messzeitpunkt ($t=24\text{ h}$) ist in allen Versuchen die Stickoxidproduktion der HMZ unter dem Einfluss des XS deutlich größer als die der Kontrollzellen. Dieses Ergebnis ist nicht signifikant, wahrscheinlich aufgrund der relativ kleinen Versuchsreihe.

Zeit t	XS		Kontrolle	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
1/2 h	10,69	6,96	4,79	0,28
2 h	13,35	6,59	4,61	1,03
6 h	14,23	5,88	5,42	0,17
12 h	23,08	9,35	4,94	0,28
24 h	18,53	15,30	5,41	0,95

Tabelle 27: Nitritgehalt pro Protein [nmol/mg] nach der jeweils angegebenen Inkubationsdauer (je vier Fläschchen pro Gruppe).

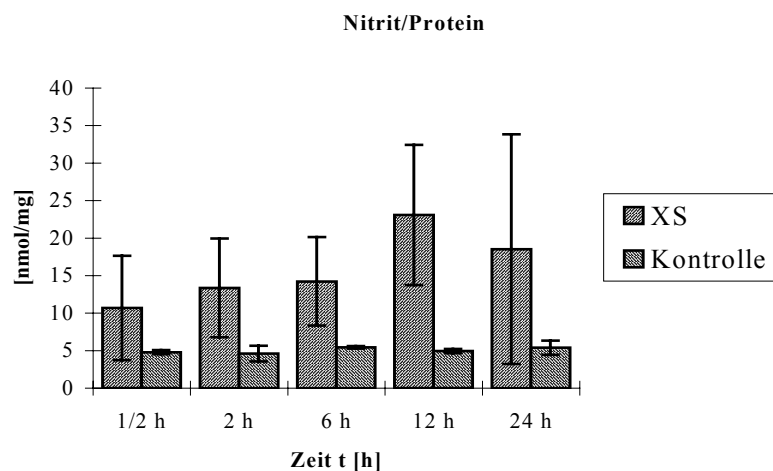


Diagramm 30: Der Nitritgehalt der HMZ unter Inkubation mit XS und SM als Kontrolle nach unterschiedlich langer Inkubationsdauer.

3.5.2. Die Stickoxidproduktion in Abhängigkeit von der PNAk-Konzentration

Um zu prüfen, ob die Stickoxidproduktion von der Antikörpermenge abhängt, werden die HMZ für 24 Stunden mit verschiedenen Verdünnungsstufen (1:2 bis 1:32) des XS inkubiert. Um den bereits initial in den verschiedenen Verdünnungsstufen unterschiedlichen Nitritgehalt auszugleichen und um etwaige Veränderungen im Nitritgehalt durch die Inkubation an sich auszuschalten, wird jeweils ein Aliquot der verschiedenen XS-Verdünnungsstufen ohne Zellen für 24 Stunden mitinkubiert. Die gemessenen Nitritwerte werden dann auf die Werte der jeweiligen Kontrollmischung bezogen, um die Nitritproduktion messen zu können. Die Nitritmenge nach 24 Stunden liegt für die Verdünnung 1:2 bei 36 nmol/mg.

Wieder sind die Unterschiede zwischen den Versuchen relativ groß. Es kommt zu einer im Vergleich zur Kontrolle deutlich vermehrten NO-Produktion unter XS-Einfluss, die mit sinkender Konzentration abnimmt.

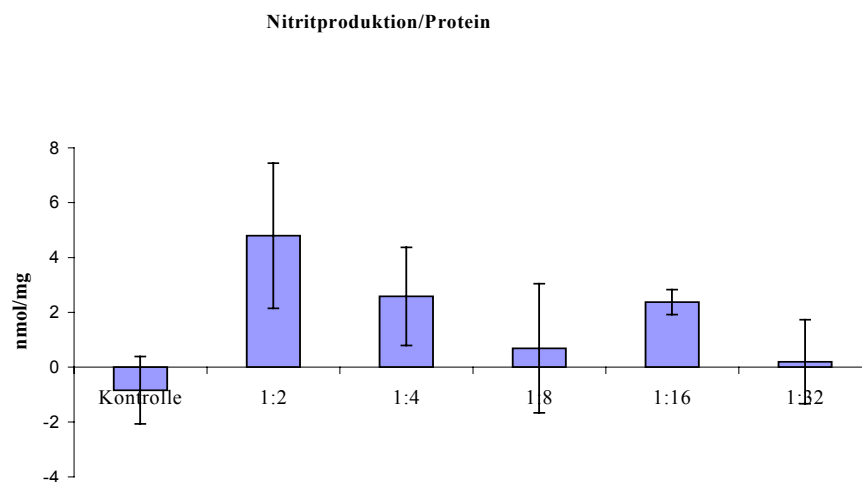


Diagramm 31: Die Stickoxidproduktion der HMZ unter Inkubation mit verschiedenen Verdünnungsstufen der HMZ.

Bei der Inkubation mit induzierten Antikörpern konnte keine reproduzierbare Veränderung im Nitritgehalt der Serum-Medium-Mischung festgestellt werden. Dies hängt vermutlich mit dem raschen Absterben der Zellen zusammen.

3.6. Einfluss von Immunglobulinlösungen auf die Herzmuskelzellen

3.6.1.1. Auswirkungen der Immunglobulinlösungen auf die Chronotropie

Die HMZ werden mit unspezifischen Antikörperlösungen inkubiert, um die Wirkung von IgG (Intraglobin F) und IgM (Pentaglobin) auf das Schlagverhalten der Zellen zu untersuchen. Wie die xenogenen Antikörper könnten diese Immunglobuline möglicherweise einen intermediären Stillstand verursachen. In den Versuchen zeigt sich jedoch kein derartiger Effekt. Im Laufe der Zeit nehmen sowohl unter Inkubation mit Pentaglobin als auch mit Intraglobin F die Frequenzen geringfügig ab.

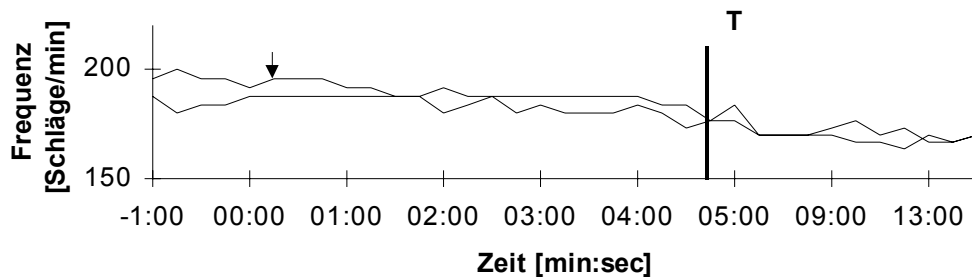


Diagramm 32: Darstellung der Kontraktionsfrequenzen unter Inkubation mit Intraglobin F. Bis zum Zeitpunkt T erfolgte die Frequenzmessung alle 15 s, danach einmal pro Minute.

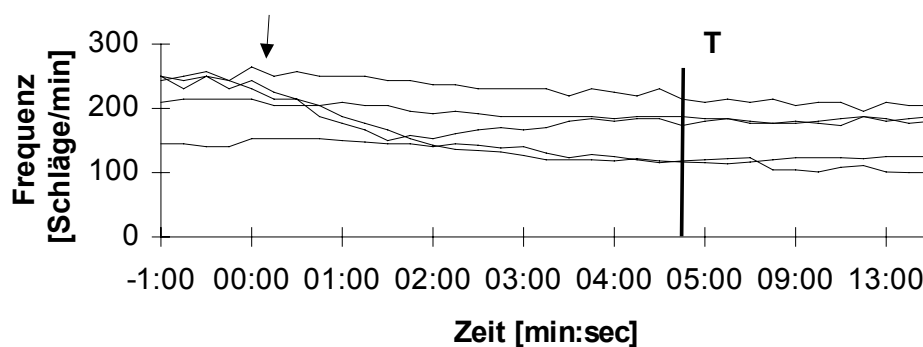


Diagramm 33: Darstellung der Kontraktionsfrequenzen unter Inkubation mit Pentaglobin. Bis zum Zeitpunkt T erfolgte die Frequenzmessung alle 15 s, danach einmal pro Minute.

3.6.1.2. Auswirkungen der Immunglobulinlösungen auf die Kontraktilitätsparameter

Wie in den Versuchen mit den IAK (siehe 3.2.1.) werden die Kontraktilitätsparameter Frequenz, Amplitude, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit gemessen. Dies geschieht zu folgenden Messzeitpunkten:

1. unmittelbar vor Serumzugabe;
2. 45 Sekunden nach Serumzugabe;
3. zum Zeitpunkt des Maximums der Amplitude;
4. zum Zeitpunkt des Minimums der Amplitude.

Während Intraglobin F, eine Lösung mit sehr niedrigem Gehalt an PNAk, keine augenfälligen Alterationen der Kontraktilität auslöst, werden die Kontraktionsparameter durch Pentaglobin im Sinne einer verstärkten Streuung (zum Zeitpunkt des Maximums) beeinflusst.

Die Messungen der Proteinmenge in den Kulturlöchern nach Ende der Inkubation und des zu diesem Zeitpunkt noch in den Zellen vorhandenen Kaliums brachten für beide Gruppen keine von den Kontrollen abweichenden Ergebnisse.

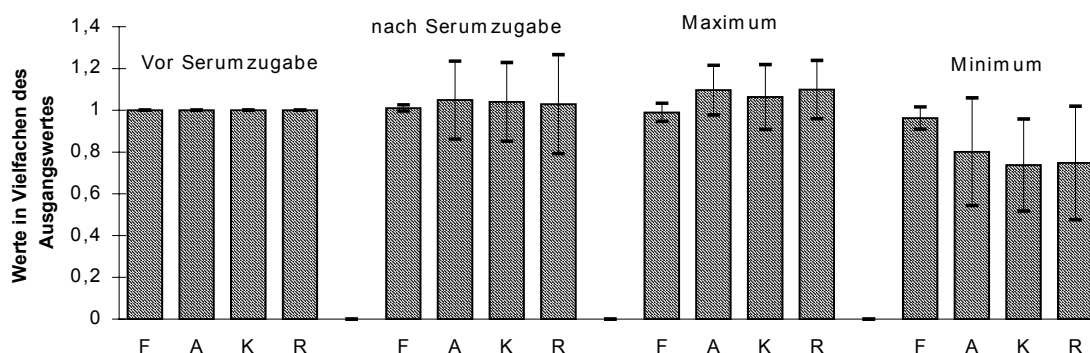


Diagramm 34: Kontraktilitätsparameter unter Inkubation mit Intraglobin F. (F = Frequenz, A= Amplitude, K=Kontraktionsgeschwindigkeit, R=Relaxationsgeschwindigkeit).

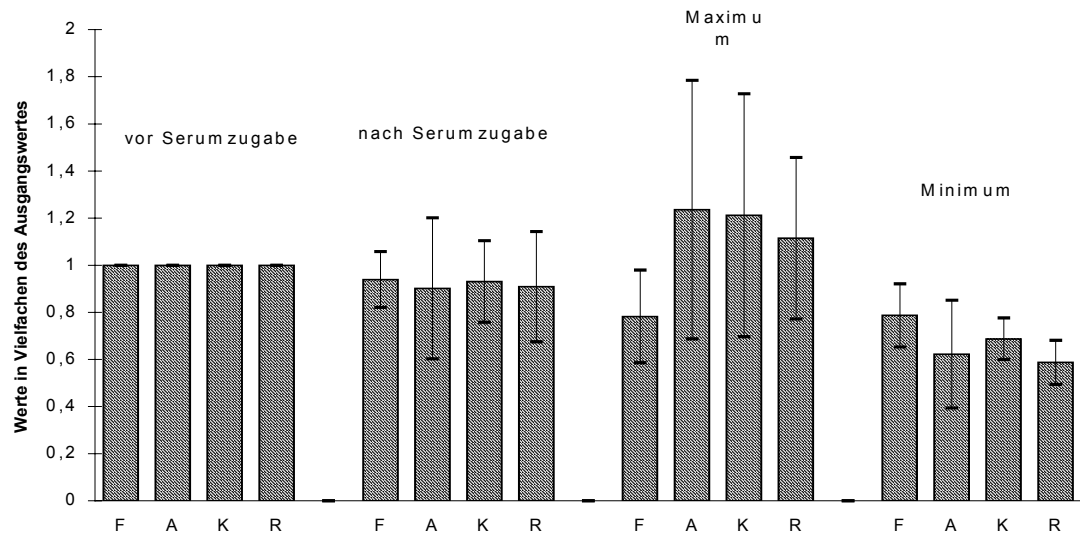


Diagramm 35: Kontraktionsparameter der Zellen unter Inkubation mit Pentaglobin.

4. Diskussion

4.1. Aktive Bestandteile und Qualität der Seren

4.1.1. Serenauswahl und -aufbereitung

In der vorliegenden Arbeit werden die Wirkungen von präformierten und induzierten Antikörpern auf Kardiomyozyten untersucht. Hierzu wird humanes xenogenes Serum und Serum mit induzierten Antikörpern von Kaninchen verwendet. Der Einfluss xenogener Seren verschiedener Spezies mit präformierten natürlichen Antikörpern wurde bereits berichtet. Dabei wurden keine qualitativen Unterschiede zwischen den Seren verschiedener diskordant xenogener Spezies festgestellt (Müller-Werdan et al. 1994, Zander 1994). Zur besseren Vergleichbarkeit wird für die hier berichteten Experimente nur das humane Serum einer Person eingesetzt. Dadurch werden interindividuelle Abweichungen im Serum als Ursache für verschiedene Ergebnisse ausgeschlossen. Das Serum der Versuchsperson zeichnet sich durch relativ hohe Titer xenogener Antikörper aus (Klein 1994a).

Die Membran, über die die Seren dialysiert werden, hat eine Porengröße von 10 kD. Sie ist somit für Elektrolyte, Glucose und andere niedermolekulare Substanzen leicht durchgängig. Höhermolekulare Stoffe, z.B. Albumin (66 kD) können die Membran nicht passieren. Insbesondere Faktoren des Komplementsystems (24 bis 410 kD) und Antikörper, deren kleinste (IgG) ein Molekülmasse von 150 kD besitzen, können nicht aus dem Serum in die Dialyseflüssigkeit übertreten. Um mögliche Veränderungen der Serumzusammensetzung auszuschließen, werden die Hämagglutinationstiter vor und nach der Dialyse gemessen. Solche Unterschiede könnten unter anderem durch starke Volumenverschiebungen zwischen Serum und Dialysiermedium aufgrund onkotischer Effekte oder durch Löcher in der Dialysemembran auftreten. Dies ist in den hier berichteten Untersuchungen nicht der Fall. Der Ausgleich der Elektrolytkonzentrationen auf die Werte von SM ist wichtig, da potentielle Veränderungen derselben per se schon zu Abweichungen im Schlagverhalten der HMZ nach einem Mediumwechsel führen könnten.

4.1.2. PNAk

Die PNAk sind ein Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr. Sie sind Teil eines entwicklungsgeschichtlich alten Abwehrsystems, das möglicherweise in der Entwicklung früher Vielzeller entstanden ist, um eine „Zellmischung“ zwischen diesen Organismen zu verhindern (Samuelsson et al. 1994). Zu ihrer Entstehung ist kein Antigenstimulus notwendig (Boyden 1966). Natürliche Antikörper können allen Immunglobulinklassen angehören, im wesentlichen handelt es sich aber um IgM (Hammer 1989, Hammer et al. 1992b, Lillevang et al. 1994), die zur Fixierung und Aktivierung des Komplementsystems vor allem über den klassischen Aktivierungsweg fähig sind (Bergmann et al. 1990). Die PNAk vom Typ IgM scheinen zu einer Ak-Familie anzugehören, zu der unter anderem auch die Isohämagglutinine gehören (Parker et al. 1996). Sie zeichnen sich durch hohe Avidität, aber geringe Spezifität der Antigen-Antikörper-Bindung aus (Hammer 1987) und sind im Gegensatz zu den spezifischen induzierten Ak polyreaktiv, d.h., ein Antikörper kann jeweils mit mehreren Epitopen reagieren (Poncet et al. 1988, Turman et al. 1991). Auch bei der HXAR sind hauptsächlich Ak vom Typ IgM beteiligt (Lindman et al. 1992, Kroshus et al. 1996, Parker et al. 1996); PNAk vom Typ IgG binden zwar auch an die Zellen, reichen alleine aber nicht zur Induktion einer funktionellen Zytotoxizität aus (Xu et al. 1994). Jede Spezies besitzt ein spezieseinheitliches Repertoire von PNAk (Pozzetto 1990). PNAk sind nicht gegen Antigene der eigenen zoologischen Familie gerichtet, und je weiter entfernt die phylogenetische Verwandtschaft zweier Spezies ist, desto mehr PNAk gegen die jeweils andere existieren (Hammer et al. 1973). Bei neugeborenen Kindern finden sich keine signifikanten Level xenoreaktiver Anti-Schwein-Ak, im Schwein-auf-Pavian-Modell ist die Überlebenszeit des Transplantates bei neugeborenen Empfängern länger (Kaplon et al. 1995b). Menschliche Neugeborene erhalten PNAk über Colostrum, Muttermilch, durch eigene Produktion und auch aus dem mütterlichen Serum durch aktiven und passiven Transfer über die Plazenta (Hammer 1993). Der wesentliche Auslöser der selbständigen PNAk-Bildung sind lebende Bakterien, bei gnotobiotisch - also keimfrei - aufgezogenen Tieren ist diese deshalb verzögert (Hammer & Hingerle 1992).

Die PNAk werden von CD5- und CD6-positiven B-Lymphozyten produziert, welche ca. 10-25% der B-Zellen ausmachen (Zola 1987). Diese, auch B1-Zellen genannten Lymphozyten, sind für die erste, T-Zell-unabhängige, Immunantwort zuständig (Casali 1989, Kasian 1991, Hardy 1991) und stellen eine große Zahl eher unspezifischer Antikörper her (Ueki 1990). Im weiteren Verlauf der Immunantwort werden sie von CD5-negativen B-Lymphozyten abgelöst,

die hochspezifische Antikörper gegen das jeweilige Antigen produzieren (Ueki 1990). Die PNAk werden in den B1-Zellen durch V-Gene kodiert, ihre polyreaktiven Antigenbindungseigenschaften werden im wesentlichen durch die H-Kette CDR3 bestimmt (Casali & Schettino 1996). Auch ohne die Anwesenheit von Komplementfaktoren können PNAk zur Aktivierung von xenogenen Endothelzellen führen (Naziruddin et al. 1996).

PNAk wird unter anderem auch eine Rolle bei der Beeinflussung von Immunprozessen (Turano et al. 1992), bei Autoimmunprozessen (Garzelli et al. 1994, Casali & Schettino 1996) und der Regulierung von Tumorwachstum (Heberman 1995) zugeschrieben. Allein ihre Bindung an Epitope kann unter Umständen schon zur Aktivierung oder auch Hemmung verschiedener Zellarten (z.B. Leukozyten oder Endothelzellen) führen (Sanfilippo & Baldwin 1997).

Die stärkste Bindung der PNAk erfolgt an Oligosaccharide mit einem α -Galaktose-Rest (Cooper 1994, Satake et al. 1994), v.a. an $\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}$ Epitope (Sandrin et al. 1993, Sandrin 94). Diese Oligosaccharide stellen eine häufige Oberflächenstruktur an Säugetierzellen dar, z.B. auch an Schweine-Endothelzellen. Auf Zellen von Menschen, Menschenaffen und Altweltaffen (Spiro & Bhoyroo 1984, Galili et al. 1987, Galili & Swanson 1991) kommen sie allerdings nicht vor, da bei diesen das Enzym $\alpha(1,3)\text{Galaktosyltransferase}$ nicht exprimiert wird (Galili 2001). Für die Xenotransplantation stellen diese Epitope und die gegen sie gerichteten PNAk ein großes Hindernis dar (Platt et al. 1990b, Galili 1993, Platt 2001). Aber auch andere Strukturen der Zelloberfläche können von den PNAk erkannt werden und könnten quasi eine zweite Barriere gegen die Xenotransplantation darstellen (Oriol 1994, Cooper 2003). Im Gegensatz zur Allotransplantation spielt der „major histocompatibility complex“ als Antigen bei der HXAR keine wesentliche Rolle (Campos et al. 1995).

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die PNAk-vermittelte HXAR zu vermeiden. Zum einen wäre eine Verminderung der Antigene vorteilhaft. Durch gentechnische Manipulation lassen sich beim Spender zusätzliche Glykosyltransferasen exprimieren, die durch kompetitive Produktion anderer Moleküle die Ausprägung von $\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}$ reduzieren (Galili 2001, Platt 2003). Durch Expression von α -Galaktosidase wird der terminale Zucker des $\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}$ -Epitopes abgespalten (Platt 2003). Des weiteren kann man die Ausprägung der $\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}$ Epitope im Gewebe des Spenders verhindern, indem die Bildung des zu ihrer Synthese notwendigen Enzyms, der $\alpha(1,3)\text{Galaktosyltransferase}$ durch genetische Manipulation in vivo gestört wird (Gustafsson et al. 1994). Die Gal-Epitope können bei Mäusen durch Gen „knock out“ zerstört

werden, eine Technik, die seit kurzem auch für Schweine verfügbar ist (Phelps et al. 2003, Polejaeva et al. 2000). Andere Strategien schließen die enzymatische Zerstörung der Oligosaccharide oder ihre Veränderung ein (McKenzie et al. 1997). Die zellvermittelte Zytotoxizität, die von PNAk vom Typ IgG vermittelt wird, lässt sich durch die Entfernung der endständigen α Gal-Epitope nicht verhindern (Watier et al. 1996). Möglicherweise stiege bei α 1,3-Gal-negativen Schweinen auch das Risiko einer Übertragung von PERV an, da deren Partikel dann auch negativ für diese Epitope wären (Platt 2000).

Zum zweiten ist es mittels verschiedener Verfahren gelungen, die natürlichen Ak oder Anti-Endothel-IgM aus dem Serum des Empfängers zu entfernen und somit die Überlebensdauer von Xenografts zu verlängern (Linn et al. 1968, Fischel et al. 1990, Gianello 1994, Latinne et al. 1994). Zu diesen Methoden gehören die Elimination der PNAk durch Plasmapherese, Absorption an Schweineorganen oder Säulen, die Galaktose α 1,3Galaktose-Epitope enthalten, die Blockierung durch Peptide oder Antikörper und auch eine gewisse Protektion der Parenchymzellen durch die in-vivo-Absorption der Ak an anderen Zellen (Astarcioglu et al. 1995, McKenzie et al. 1997, Schussler et al. 1997). Andererseits führt die Tilgung der PNAk nicht in allen Experimenten zur Verlängerung der Überlebenszeit des Transplantats, wofür vor allem das Komplementsystem verantwortlich gemacht wird (Pruitt et al. 1993).

Schließlich können die Bildung von PNAk durch hochdosierte Cyclophosphamid-Gabe und die dadurch verursachte Suppression der B-Zellen vermindert werden (Morschheuser et al. 1997), und die Zeit bis zur Abstoßung von Xenotransplantaten durch verschiedene immunsuppressive Therapieschemata verlängert werden (Steinbrüchel et al. 1994).

Unter „Accommodation“ versteht man das Phänomen, dass das gefäßversorgte Transplantat trotz des Vorhandenseins von Ak gegen das Endothel nicht geschädigt wird (Platt et al. 1990a, Bach et al. 1991). Erklärungsversuche beinhalten eine Abnahme der Wechselwirkung zwischen Ak und Antigen, eine geringer werdende Empfindlichkeit der Endothelzellen oder die Erholung des Organs von der Schädigung durch die Transplantatentnahme beim Spender und die Reperfusion, während das Empfängerserum frei von Ak und/oder Komplement ist. Neuere Erklärungsversuche beinhalten den Einfluß von Apoptose-Inhibitions-Genen (Platt 2003). Bei einem späteren Wiederauftreten von Ak und/oder Komplement ist das Endothel dann stark genug um standzuhalten (Platt 1994).

4.1.3. IAK

Die IAK werden nach Antigenkontakt im Laufe der humoralen Immunantwort gebildet und sind spezifisch für das auslösende Antigen. Sie können auch eng verwandte Antigene binden, allerdings mit einer geringeren Bindungsenergie. Gegen ein Antigen werden normalerweise viele verschiedene Ak aus verschiedenen Gruppen und Klassen gebildet. Ein Ak kann allerdings strukturell unterschiedliche Determinanten binden und zwar auch an verschiedene Bindungsstellen der antigenbindenden Region (Richards et al. 1975). In der frühen Phase der Immunantwort werden vor allem IgM, später überwiegend IgG durch die B-Lymphozyten gebildet. In der Transplantationsimmunologie spielen sie in zwei wesentlichen Fällen eine wichtige Rolle. Entweder der Empfänger hatte früher schon einmal Kontakt mit einem Antigen des Spenderorgans. Dann kann es zur hyperakuten Abstoßung (Sanfilippo & Baldwin 1997) oder zumindest zu häufigeren Abstoßungsepisoden (Latif et al. 1995) kommen. Oder aber der Empfänger bildet nach der Transplantation de novo Antikörper gegen das fremde Gewebe. Auch dies führt im Endeffekt zur Abstoßung des Transplantats. Auch hierbei spielen im Falle einer Xenotransplantation die stark immunogenen $\alpha(1,3)$ Gal-Epitope neben anderen Antigenen eine wichtige Rolle (Galili 2001, Cooper 2003). Eine zumindest weitgehende Supprimierung der Antikörper-Produktion ist mittels zahlreicher Methoden möglich (Cooper et al. 2002), auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

4.1.4. Komplementsystem

Der Begriff Komplementsystem wurde von Ehrlich eingeführt, um die Aktivität eines Serums zu beschreiben, das unter dem Einfluss spezifischer Ak Bakterien lysierte. Das Komplementsystem ist ein System hochmolekularer Proteine, die im Blutplasma und in anderen Körperflüssigkeiten vorkommen. Nach Aktivierung dient es der Opsonierung, der Aktivierung von Leukozyten und der Zytolyse. Die einzelnen Komponenten liegen als inaktive Vorstufen vor, die unter bestimmten Bedingungen durch proteolytische Spaltung oder Protein-Komplexbildung kaskadenartig aktiviert werden. Wenn Spaltprodukte entstehen, wird das kleinere Fragment meist mit a, das größere mit dem Suffix b bezeichnet. Die Komplementaktivierung läuft zum einen über den klassischen, zum anderen über den alternativen Aktivierungsweg. In beiden Fällen kommt dem Faktor C3 eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung der Kaskade zu.

Zur Auslösung des klassischen Weges bedarf es eines IgM- oder mindestens zweier IgG-Moleküle, die als Ag-Ak-Komplex vorliegen. Er verläuft über die Faktoren C1q, C1r, C1s, C4, C2 und C3. Nach Bindung von C1q an den Ag-Ak-Komplex erfolgt die Ca^{2+} -abhängige Zusammenlagerung eines Komplexes aus einem Molekül C1q und je zwei Molekülen C1r und C1s (Roitt et al. 1995). Über Spaltung von C4 und C2 entsteht schließlich der aktivierte Komplex $\overline{\text{C4b2b}}$, die sogenannte C3-Konvertase.

Der alternative Aktivierungsweg wird unter Beteiligung der Komponenten D (Proaktivator-Konvertase), B (Proaktivator), Properdin und C3b in Gang gesetzt. Durch eine ständige geringgradige Spontanhydrolyse wird ständig natives C3 gespalten. Unter Beteiligung der Faktoren B und D wird auch auf dem alternativen Weg eine Kaskade aktiviert, die von der Bindung von C3b an eine Oberfläche abhängig ist. Diese Bindung wird normalerweise von speziellen Oberflächenmolekülen der Zelle verhindert.

Beide Wege münden in eine gemeinsame Endstrecke, die zur Membranschädigung durch einen Komplex der Komponenten C5b-9 führt, den sogenannten „membrane attack complex“ (MAC). Dessen Bildung wird durch enzymatische Spaltung von C5 durch die Konvertasen des klassischen ($\overline{\text{C4b2a3b}}$) oder alternativen Weges ($\overline{\text{C3bBb3b}}$) initiiert. Konsekutiv lagern sich C6 und C7 an und der Komplex wird in die Zellmembran eingebaut. An diesen membranständigen Komplex binden dann C8 und bis zu vierzehn C9-Moleküle (Roitt et al. 1995).

Spaltprodukte des Komplementsystems (C1q, Bb, C3b, C3dg, C3a, C5a) beeinflussen sowohl die Lokalisation und Aktivierung als auch die Effektor-Funktionen von Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, indem sie als Liganden für spezifische Rezeptoren dieser Zellen fungieren (Baldwin et al. 1995).

Das Komplementsystem spielt sowohl bei der akuten als auch bei der antikörpervermittelten hyperakuten Abstoßungsreaktion allogener Transplantate eine Rolle (Brauer et al. 1995). Es ist ein wesentlicher Faktor für die HXAR (Platt & Bach 1991). Die Bedeutung des Komplementsystems für das Überleben xenogener Transplantate zeigt sich durch mehrere Tatsachen (Platt 1994): Erstens sinken nach der Anastomosierung eines Xenografts an das Gefäßsystem des Empfängers die Komplementlevel im Blut des Empfängers ab. Dies beruht vermutlich auf einem Verbrauch im Transplantat. Zweitens kommt es zu einer raschen Ansammlung von Komplement in abgestoßenen Xenotransplantaten. Schließlich konnte gezeigt werden, dass

sich die Überlebenszeit xenogener Organe verlängert, wenn die Transplantation auf Empfänger erfolgt, die einen Defekt des Komplementsystems besitzen (Zhow et al. 1990) oder wenn das Komplementsystem im Serum des Empfängers inaktiviert wird (Moberg et al. 1971). Auch bei anderen Krankheiten, z.B. Myokarditis, ist das Zusammenspiel von Ak und Komplement von Bedeutung (Drude et al. 1991).

Präformierte Antikörper aktivieren den klassischen Weg der Komplementkaskade (Bergmann et al. 1990). Im Xenotransplantationsmodell Schweineorgan auf Primaten wird das Komplement im wesentlichen auf diese Weise in Gang gesetzt (Dalmasso & Platt 1993, Kaplon et al. 1995). Das Komplementsystem wird dafür verantwortlich gemacht, dass eine Elimination der PNAk nicht in allen Experimenten zur Verlängerung der Überlebenszeit des Transplantats führt (Pruitt et al. 1993). In der Abwesenheit von Ak gegen die xenogene Zelloberfläche kommt es in einigen Modellen zu einer zumindest teilweisen HXAR. Diese wird durch eine direkte Aktivierung des Komplementsystems an der fremden Oberfläche über den alternativen Weg verursacht (Platts-Mills & Ishizaka 1974, Miyagawa et al. 1988, Johnston et al. 1991, Zhao et al. 1994). Bei der Perfusion von Lungen von $\alpha(1,3)$ Gal-Knock-out-Mäusen mit humanem Serum ist ein dem Wildtyp vergleichbarer Perfusionsabfall als Ausdruck einer HXAR erst durch Komplementinaktivierung vermeidbar (Miyata & Platt 2003). Auch Ischämie, Reperfusion eines Gewebes nach längerer Unterbrechung der Blutzufuhr, Infektionen und Dysregulation können eine Aktivierung der Komplementkaskade auslösen (Sanfilippo & Baldwin 1997).

Zur Hemmung des Komplementsystems stehen verschiedene Methoden zur Verfügung (McKenzie 1997). Cobra venom factor dezimiert das Komplementsystem in vitro und in vivo und verlängert die Zeit bis zur Transplantatabstoßung (Gewurz et al. 1967, Leventhal et al. 1993), wirkt in vivo aber zumindest in höheren Dosen toxisch. Monoklonale Ak gegen C3 sind in der Lage, die Überlebenszeit von Xenotransplantaten zu verlängern, können aber zu Blutungen führen (Kemp et al. 1994). Mit Hilfe des Antikomplement-Wirkstoffes K76 COOH, der vor allem die C5-Aktivierung behindert, lässt sich die Lebensdauer von Fremdorganen ebenfalls verlängern. Dies gelingt vor allem, wenn gleichzeitig auch durch Chemotherapeutika (Cyclophosphamid und FK506) die Antikörperbildung verhindert wird (Tanaka et al. 1995). Das Komplementsystem ist hitzelabil und lässt sich in vitro durch 30minütiges Erwärmen des Serums auf 56°C inaktivieren.

Eine weitere Möglichkeit der Komplementinaktivierung stellen Regulationsproteine dar. Dabei handelt es sich um Faktoren der Zellmembran, die speziesspezifisch sind (Lachmann 1991). Zu diesen Faktoren gehören DAF (CD55), MCP (CD46) und CD59 (Cozzi & White 1995). „Decay accelerating factor“ (DAF) ist ein Regulationsprotein des klassischen und alternativen Weges der Komplementaktivierung, das die Bindung von C2 und C4b hemmt, die Dissoziation des C3bBb-C3-Konvertaseenzym beschleunigt und somit die Komplementkaskade auf dem Niveau von C3b blockiert (Roitt et al. 1995, Rosengard et al. 1995). „Membrane cofactor protein“ (MCP) und CR1 sind ebenfalls bedeutsam für die Verhinderung der Komplementaktivierung. CD59 und der homologe Restriktionsfaktor (HRF) sichern körpereigene Zellen vor der Lyse durch den MAC (Roitt et al. 1995). Transgene Tiere bzw. Zellen für einen oder mehrere dieser Faktoren existieren. Diese Zellen sind dadurch vor der Lyse durch das Komplementsystem geschützt (Wang et al. 1991, Dalmaso et al. 1991, White et al. 92, Oglesby et al. 1992). Organe von transgenen Schweinen zeigen längere Überlebenszeiten und nähren die Hoffnung auf einen praktischen Einsatz der Xenotransplantation (Braidley et al. 1996, White & Calne 1996). Bei diesen Versuchen werden entweder Schweine gezüchtet, bei denen der Bauplan für die Faktoren in das Genom integriert wurde (Fodor et al. 1994, Schmöckel et al. 1996) oder transgene Erythrozyten übertragen die Faktoren während der Perfusion auf die Endothelzellen des xenogenen Organs (McCurry et al. 1995). Bei der xenogenen Lebertransplantation kommt ein anderes Phänomen zum Tragen. Durch diese Transplantate wird von der neuen Leber spenderspezifisches Komplement gebildet, und auf diesem Wege die Überlebenszeit auch anderer Xenotransplantate verlängert (Starzl et al. 1994, Valdivia et al. 1995).

Ein durch den MAC des Komplement geformter Kanal hebt die funktionelle Impermeabilität der Zellmembran für Kationen auf (Fries & Frank 1987, Morgan 1989). Dies kann die Lyse der Zellen verursachen. Bei kernhaltigen Zellen führt ein Angriff des MAC nicht wie z.B. bei Schaferythrozyten in allen Fällen zur Lyse. Zur Lyse kernhaltiger Zellen sind im Gegensatz zur Auflösung von Erythrozyten mehrere C6-Moleküle bzw. mehrere durch den MAC geformte Kanäle notwendig (Koski et al. 1983). In sublytischen Konzentrationen hingegen wird das intrazelluläre Ionengleichgewicht vorübergehend gestört. Es resultieren verschiedene intrazelluläre Antworten:

1. Vermutlich über G-Proteine vermittelt, steigt die Adenylatcyclase-Aktivität und damit die intrazelluläre cAMP-Konzentration an. Außerdem kommt es zu einer Vermehrung von

Proteinkinase C (Carney et al. 1990). Das cAMP hat einen protektiven Effekt auf die Zellen, diese können durch Inkubation mit cAMP vor der Lyse geschützt werden (Lo & Boyle 1972).

2. Das intrazelluläre Kalzium steigt, sowohl durch einen Einstrom von außen als auch durch eine Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Morgan 1989, Cybulsky et al. 1990, Berger et al. 1993). Dadurch steigt auch die Kontraktionsamplitude adulter Ratten- und Meer-schweinchen-Ventrikelzellen signifikant an, wobei die Ursache keine unspezifische Schä-digung und Permeabilitätssteigerung der Zellmembran ist, sondern eine selektive und re-versible Änderung der Ca^{2+} -Durchlässigkeit (Berger et al. 1993). Es resultiert eine gesteigerte intrazelluläre Kalziumkonzentration und eine Aktivierung der Phospholipasen C und A_2 , die eine Freisetzung von Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-Triphosphat nach sich zie-hen (Wiedmer et al. 1987, Casey & Gilman 1988, Morgan 1989, Cybulsky et al. 1990). Daraus resultiert eine Vermehrung der Proteinkinase C, die zum Schutz der Zellen vor Ly-se durch das Komplementsystem beiträgt (Cybulsky et al. 1990).
3. Auch der Eikosanoid-Stoffwechsel wird angeregt (Hansch et al. 1988). DAG kann den Arachidonsäurestoffwechsel aktivieren (Forth et al. 1992). Es wurde nachgewiesen, dass Einfügen des MAC in die Membran in sublytischen Konzentrationen die Synthese und die Freisetzung von Metaboliten der Arachidonsäure stimuliert, unabhängig von den Kompo-nenten C3a, C3b, C5a (Hartung et al. 1983, Imagawa et al. 1987).

Die Wirkung der Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a auf HMZ hingegen ist weitgehend unge-klärt (Werdan et al. 1993). Aktivierte Bestandteile der Komplementkaskade und der MAC lösen die Produktion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Eikosanoiden und die Vermeh-rung von Zellmolekülen wie Selectinen, Integrinen und MHC aus (Sanfilippo & Baldwin 1997). Die durch das Komplement verursachten Ereignisse führen vor allem bei den klinisch relevanten Schwein-auf-Mensch-Modellen nur selten zum Zelltod (Platt et al. 1991c). Viel-mehr kommt es zur Aktivierung der Endothelzellen und Ausschüttung von Heparan-Sulfat (Platt et al. 1991a, Platt et al. 1991b), zur Änderung der Zellform von Endothelzellen (Saadi et al. 1994) und zur Ausbildung von Prothrombinase-Komplexen. Dies resultiert schließlich in einer Abstoßung des Transplantats.

4.2. Einfluss der induzierten Antikörper im in-vitro-Modell eines xenogenen Systems

4.2.1. Kontraktilitätsparameter bei Inkubation bis 30 min.

4.2.1.1. Kontrollversuch

Wenn beim Medienwechsel unter dem Mikroskop, wie er in 2.4.2 beschrieben ist, nur SM als Kontrolle eingesetzt wird, kommt es in keinem Fall zu einem Stillstand oder anderen auffälligen Veränderungen der Kontraktionsfrequenz, was im übrigen auch schon früher (Klein 1994) gezeigt werden konnte. Ein Einfluss des mechanischen Versuchsablaufs per se auf das Schlagverhalten des HMZ-Monolayers kann somit ausgeschlossen werden. Dies stellt eine wichtige Kontrolle dar um auszuschließen, dass Phänomene als seruminduziert gewertet werden, die lediglich durch Scherkräfte der Medien bei Absaugen und Hinzupipettieren oder durch das kurzzeitige Fehlen der Umspülung mit Medium während des Wechsels verursacht werden.

Die Tatsache, dass die Kontraktionen einer Zelle als repräsentativ für den gesamten Monolayer ausgewertet werden können, wurde ebenfalls in früheren Untersuchungen gezeigt (Klein 1994). Die Zellen haben zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung, d.h. 48 bis 72 Stunden nach Kultivierungsbeginn, einen synchron schlagenden Monolayer im Sinne eines funktionellen Synzytiums gebildet (Werdan & Reithmann 1987, Werdan & Erdmann 1989).

4.2.1.2. Auswirkungen der IAK auf die Chronotropie der HMZ

In allen 13 Versuchen mit K-RHS kommt es innerhalb von maximal 21 Minuten zu einem anhaltenden Stillstand. Dabei spielt es keine Rolle, ob dialysiertes oder undialysiertes Serum verwendet wird. Daraus lässt sich schließen, dass die verantwortlichen Serumbestandteile die Dialysemembran nicht passieren können, ihr Molekulargewicht also größer als 10000 Dalton ist. Der Hämagglutinationstiter von K-RZK ist nicht messbar höher als der von K-RHS. Trotzdem hören die Zellen unter der Inkubation mit K-RZK signifikant früher endgültig auf zu schlagen. Dafür kommen im wesentlichen drei Ursachen in Frage:

1. Das Serum K-RZK enthält zusätzlich zu den Ak weitere Faktoren, die in K-RHS nicht oder in geringerer Menge vorhanden sind.

2. Der Hämagglutinationstiter stellt kein ausreichend genaues Maß dar, um die Menge der spezifischen Ak wirklich zu messen. Das Kaninchen, das mit Ratten-HMZ aus Kultur immunisiert wurde, hat möglicherweise mehr Ak gebildet als diejenigen, die mit dem Homogenisat aus gesamten Herzen immunisiert wurden.
3. Die Ak, die nach Immunisierung mit reinen HMZ ohne andere Zellen, wie z.B. Fibrozyten, Endothelzellen usw., gebildet wurden sind möglicherweise spezifischer, deshalb bindet eine größere Zahl von HMZ-spezifischen Antikörpern und der finale Stillstand tritt früher auf.

Hypothese eins erscheint unwahrscheinlich, da in etwa gleich alte Kaninchen der selben Rasse immunisiert wurden, die im selben Stall aufgezogen wurden. Um zwischen den Hypothesen zwei und drei zu differenzieren, bedürfte es aufwendiger Bindungsstudien, die den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen würden. Aufgrund des stärkeren Effektes und eines vergleichbaren Aufwandes in der Herstellung bietet es sich für zukünftige Untersuchungen jedoch an, mit HMZ aus Kultur zu immunisieren.

Die Frage, ob der endgültige Stillstand durch kardiodepressive Faktoren bedingt ist, die lediglich die Kontraktionen der HMZ verhindern, oder durch den Tod der Zellen, kann durch nur funktionelle Parameter nicht beantwortet werden. Ihr wird durch die Untersuchungen zur Zytotoxizität der Antikörper nachgegangen. Eine Zerstörung der Zellen durch die IAk und eine Aktivierung des Komplementsystems als Ursache des endgültigen Stillstands erscheint jedenfalls wahrscheinlich.

Zu einer Ablösung der noch schlagenden HMZ vom Boden der Kulturlöcher, wie sie aus früheren Versuchen beschrieben ist (Zander 1994), kam es nur in zwei Fällen. In beiden wurden Costar-Plates als Kulturgefäß benutzt, in denen die HMZ etwas schlechter am Boden haften. Als Ursachen für diese Änderung im Verhalten der Zellen kommt eine Veränderung der Kollagenbeschichtung des Kulturlochbodens durch den Hersteller in Frage, so dass die Zellen besser haften. Dafür spricht auch, dass eine Lösung einzelner Zellausläufer vom Boden oder in Einzelfällen auch ganzer Zellen in allen Versuchen beobachtet werden kann.

Der intermediäre Stillstand mit dem anschließenden spontanen erneuten Schlagbeginn tritt in sechs von 13 Versuchen mit K-RHS und in einem von vier Versuchen mit K-RZK auf. Er ist ein Phänomen, das von der Inkubation der Zellen mit PNAk bekannt ist (Klein 1994, Müller-Werdan et al. 1994). Die Zeit bis zum Auftreten des Stillstandes beträgt für IAk (K-RHS)

42,0'' (SD 9,3'') und für PNAk 62,3'' (SD 31,5'') (Klein 1994), die Dauer des Stillstandes für IAK (K-RHS) im Mittelwert 121,8'' (SD 61,0''), für PNAk 144,5'' (SD 88,2'') (Klein 1994). Die Ähnlichkeit des Phänomens sowie auch die Übereinstimmung in zeitlichem Auftreten und Dauer legt die Vermutung nahe, dass die Ursachen für den Stillstand durch die IAK die gleichen sind wie bei PNAk. Es könnte also zu einer unspezifischen Erhöhung des Eingangswiderstandes und einem Rückgang der Erregbarkeit der Zellen kommen. Eine eingehende Diskussion dieses Phänomens findet sich unter Punkt 4.7.2. Der Grund dafür, dass der intermediäre Stillstand nicht einmal in der Hälfte der Fälle auftritt, könnte darin zu suchen sein, dass IgG „schlechter isolieren“ als IgM. Möglicherweise sind aber auch weitere Unterschiede der Seren und der Wirkungsweise der unterschiedlichen Ak von Bedeutung.

Die Tatsache, dass nach Zugabe der IAK keine Frequenzsteigerung beobachtet wird, sondern ein Abfall der Frequenz, legt nahe, dass das Komplementsystem mit seinem MAC in diesem Fall nicht nur in sublytischen Konzentrationen an den Zellen angreift (weitere Erklärung siehe auch 4.7.2).

4.2.1.3. Kontraktionsparameter

Nach Zugabe der IAK kommt es durchweg zu einer Abnahme der Frequenz. Dies steht im Gegensatz zu der positiv chronotropen Wirkung der PNAk. Dies deutet auf grundsätzliche Unterschiede im Wirkungsmechanismus hin. Als Erklärung für den Frequenzabfall könnte die vergleichsweise schwerere Schädigung der Zellen dienen. Dazu gehört die nachgewiesene Verarmung an energiereichen Phosphaten als Energiequelle der Zelle, wie sie bei der komplementvermittelten Lyse von Zellen auftritt (Morgan 1989). Auch andere zytotoxische Einflüsse auf die HMZ, z.B. Sauerstoffradikale, führen zu einer Verminderung der spontanen Kontraktionsfrequenz (Wagenknecht et al. 1989).

Der Verlauf der anderen Parameter richtet sich danach, ob ein intermediärer Stillstand auftritt oder nicht. Tritt ein Stillstand auf, so fallen alle drei Kontraktilitätsparameter ab, ansonsten steigen sie nach Serumzugabe an. Der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ist allerdings nicht signifikant, die Standardabweichungen innerhalb der einzelnen Gruppen relativ groß. Ein guter Teil der Zunahme der maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit bei einer Steigerung der Kontraktionsamplitude dürfte durch die Abnahme der Frequenz erklärbar sein.

Insgesamt unterscheidet sich das Schlagverhalten nach Zugabe von Serum mit IAK deutlich von dem Verhalten nach Zugabe von Serum mit PNAk (Klein 1994). Bei den IAK überwiegt wohl eine unspezifische zytotoxische Wirkung gegenüber potentiellen Einflüssen auf Erregungsbildung und -leitung oder Botensysteme der HMZ.

4.2.2. Einfluss der IAK auf die Frequenz in Abhängigkeit von der Konzentration

Die Tatsache, dass der 30min-Wert der Frequenz für Serum mit IAK in der niedrigsten Verdünnung (1:2) nicht bei Null liegt, erklärt sich daraus, dass einzelne Zellen in den Wells zu finden sind ($n = 6$ von 24, alle an einem Versuchstag), die noch schlagen. Bei vierstündiger Inkubation schlugen schon nach einer Stunde bei dieser Verdünnung in insgesamt 27 Kulturlöchern keine Zellen mehr. Diese Ergebnisse belegen die starke Zytotoxizität der IAK. Die Frequenzsteigerung bei vierstündiger Inkubation mit den Verdünnungen 1:16 und 1:32 trotz des Stillstandes einiger Zellen deutet möglicherweise auf Effekte des Komplementsystems in sublytischer Konzentration hin, die auch für die Veränderungen des Schlagverhaltens durch XS verantwortlich sein könnten (siehe 4.7).

Es gibt in allen Versuchen und an allen Versuchstagen immer einmal wieder Kulturlöcher, in denen die Zellen nicht schlagen. Normalerweise lassen sich die Kontraktionen der Zellen aber elektrisch stimulieren, bei den mit zytotoxischen Ak inkubierten Zellen gelingt dies nicht. Aus der unterschiedlichen Reaktion der Zellen auf externe elektrische Stimulation kann man schließen, dass die Ursache des Stillstandes unter der Inkubation nicht einfach nur das Fehlen eines geeigneten Schrittmachers oder erschwerte Ausbreitung der Erregung über den Zellrasen ist. Sehr lange dauernde Inkubation (24 h) mit den Antikörpern führt auch in höheren Verdünnungen (1:16 und 1:32) noch zu einem Stillstand bzw. sogar zur Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturlöcher. Eventuell erschöpfen sich die Kompensationsmechanismen der Zellen gegen Serum mit induzierten Ak im Laufe der Zeit.

Die Tatsache, dass eine Inaktivierung des Komplementsystems den frequenzmindernden bzw. kontraktionsverhindernden Effekt aufhebt, zeigt eine entscheidende Mitwirkung des Komplements für diese Effekte an. Es sind also möglicherweise verschiedene Serumkomponenten an den Wirkungen von Serum mit IAK beteiligt. Herauszufinden, welche dies sind, bedarf weiterer Untersuchungen.

Unter diesem Aspekt lässt sich die etwas stärkere Wirkung der nicht dialysierten Seren möglicherweise aus einer geringen Verminderung von Komplementfaktoren oder deren Aktivierung und Verbrauch durch die Dialyse herleiten.

4.2.3. Einfluss unterschiedlicher Serumgruppen der IAK

Sowohl K-RHS als auch K-RZK bewirken nach zweistündiger Inkubation einen kompletten Stillstand der Zellen. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Kontraktionsfrequenzen der HMZ unter inaktiviertem oder absorbiertem Serum praktisch nicht von der Kontrolle. Es bedarf also der Anwesenheit von IAK und Komplement, um den kompletten Stillstand der HMZ zu verursachen. Somit kann eine durch die an die Zellen bindenden IAK ausgelöste Zytotoxizität des Komplementsystems als Grund für den Stillstand der Zellen angenommen werden.

Es stellt sich für weitere Versuche also die Frage, inwiefern sich die zellschädigende Wirkung der PNAk und der IAK, die beide an den HMZ binden und Komplement aktivieren können, unterscheiden.

4.3. Zytotoxizität der IAK und PNAk im Vergleich

4.3.1. Diskussion der Ergebnisse der Proteinbestimmung

Eine Methode des Zytotoxizitätsnachweises stellt die Bestimmung des am Ende der Inkubationszeit in den Kulturlöchern enthaltenen Proteins dar. Ein Absterben der Zellen sollte sich durch ein Absinken der Proteinwerte bemerkbar machen. Die Ergebnisse weisen jedoch Unterschiede zwischen den Gruppen aus: Die Inkubation mit IAK in verschiedenen Aufbereitungen über zwei Stunden führt zu keinen signifikanten Änderungen der Proteinkonzentration. Erst nach vierstündiger Inkubation zeigt sich ein leichter konzentrationsabhängiger Abfall der Proteine. Lange dauernde Inkubation mit PNAk über 6, 12 oder 24 h bewirkt im Gegensatz dazu sogar eine Erhöhung der Proteinkonzentration pro Kulturloch, die nach Absorption der Ak bzw. Inaktivierung des Komplements noch deutlicher ausfällt.

Die Zunahme der Proteinmenge bei längerer Inkubation mit PNAk dürfte auf einer Vermehrung der Bindegewebszellen unter dem Einfluss der mit dem Serum zugeführten Wachstumsfaktoren liegen. Dies deckt sich mit früheren Beobachtungen (Klein 1994). Die normale Züchtung der HMZ erfolgt vor allem deswegen in serumfreiem Medium, weil sich der Proteingehalt der Kultur während der dreitägigen Kultivierungsphase in serumhaltigem Medium

durch eine Proliferation von Bindegewebszellen um 90% steigern würde. Bei der Züchtung in serumfreiem Medium erhöht sich der Proteingehalt in dieser Zeit aufgrund geringerer Vermehrungsfähigkeit der Bindegewebszellen nur um 3% (Werdan & Reithmann 1987).

Für die weitere Proteinvermehrung nach Inaktivierung des Komplementsystems und/oder Absorption der Ak können im wesentlichen zwei mögliche Erklärungen angeboten werden. Zum einen könnten die PNAk unter Aktivierung des Komplementsystems eine gewisse zytotoxische Wirkung ausüben, welche durch die Zunahme der Fibroblasten in der Kultur allerdings mehr als kompensiert würde. Die zweite Möglichkeit wäre, dass die Zellteilungsbedingungen für die Fibroblasten unter Anwesenheit von PNAk und Komplementsystem schlechter sind als in deren Abwesenheit. Auch die Tatsache, dass nach sechsständiger Inkubation mit XS die Zunahme des Proteins noch nicht signifikant ist, ließe sich mit diesen beiden Möglichkeiten erklären.

Die proliferative Wirkung von Serum wird durch die IAK aufgehoben. Allerdings wäre die Beobachtungszeit von zwei Stunden für eine deutliche Vermehrung der Bindegewebszellen möglicherweise auch zu kurz, wie man sie zumindest für inaktiviertes und absorbiertes Serum erwarten würde. Aus dem konzentrationsabhängigen Abfall der Proteine nach vierständiger Inkubation kann noch keine Zytotoxizität nachgewiesen, allenfalls vermutet werden. Als Erklärungen bieten sich an: Entweder die IAK wirken nicht zytotoxisch. Dagegen sprechen aber die Ergebnisse der Chronotropiemessungen. Oder die Zellen bleiben auch nach ihrem Tod zunächst weiter am Boden des Kulturgefäßes haften, so dass sich die Proteinkonzentration trotz Zytotoxizität der Ak nicht ändert. Zur weiteren Abklärung bedarf es also weiterer Methoden zur Zytotoxizitätsbestimmung.

4.3.2. Kaliumgehalt

Da die Proteinmessungen keine eindeutigen Aussagen über die Zytotoxizität der Ak zulassen, sind feinere Methoden zum Nachweis oder Ausschluss der Zytotoxizität erforderlich. Eine etablierte Methode stellt die Messung des Kaliums dar, welches nach Beendigung der Inkubation noch in den Zellen enthalten ist.

Die Inkubation mit induzierten Antikörpern in abnehmenden Verdünnungen führt zu einem konzentrationsabhängigen Abfall der Konzentration von Kalium/Protein. Nach Auswaschen des Überstandes und Auflösung der Zellen in Natronlauge findet sich nur noch eine verminderte Kaliummenge. Ein möglicher Grund ist eine Schädigung der Zellmembran und damit

ein Ausstrom von Kalium aus den Zellen. Eine andere Erklärung bietet eine Störung der zellulären Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Elektrolythomöostase, z. B. eine Hemmung oder Störung der Na^+/K^+ -ATPase. In jedem Fall deutet eine Erniedrigung des Kaliums auf eine Schädigung der Zellen hin, ein Abfall bis gegen Null zeigt den Tod der Zellen an. Die Verminderung des Kaliumwertes ist abhängig vom Grad der Zellschädigung bzw. dem Anteil der geschädigten Zellen am Monolayer.

Es stellt sich die Frage, ob verschiedene Serumaufbereitungen eine unterschiedlich starke Verminderung der Kaliumkonzentration hervorrufen. Wenn eine Aktivierung des Komplementsystems durch die IAK die Ursache der Zellschädigung darstellen sollte, dann müsste sowohl eine Entfernung der AK als auch eine Inaktivierung der Komplementfaktoren die Verminderung des intrazellulären Kaliums verhindern. Dies ist, wie unter Punkt 3.3.2 beschrieben, der Fall.

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass es sich bei der Ursache für die Kaliumverminderung um eine Zytolyse handelt, die vom Komplementsystem einerseits und von den induzierten Antikörpern andererseits abhängt.

Aufgrund des endgültigen Stillstandes der Zellen nach maximal 21 min. würde man erwarten, dass nach dieser Zeit der Zelltod eintritt und kein Kalium mehr in den Zellen gehalten werden kann bzw. das Kalium aus den durch Zerstörung der Zellmembran „offenen“ Zellen ausgewaschen wird. Die Tatsache, dass es in den ersten 30 min. des Beobachtungszeitraumes zu einem Abfall der Kaliumwerte kommt, der nicht bis auf Null reicht, kann damit erklärt werden, dass nach der Zellschädigung das Kalium erst langsam aus den Zellen herausdiffundiert bzw. ausgewaschen wird, weil keine komplette Zytolyse stattfindet. Dazu passt auch die Beobachtung, dass sich in diesem Zeitraum die Morphologie der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop nicht grundlegend ändert, abgesehen von der Ablösung einzelner Zellen oder Zellausläufer. Auch bei der Schädigung von HMZ durch Sauerstoffradikale tritt der Stillstand geringfügig vor dem Absinken des K^+ -Gehaltes der Zellen auf (Wagenknecht et al. 1989).

Die PNAk hingegen induzieren keinen vergleichbaren Effekt auf die Zellen. Sie wirken folglich selbst bei Inkubation über 24 Stunden nicht zellzerstörend.

4.3.3. Messung der energiereichen Phosphate

Falls die Zellen durch Inkubation mit IAK abgetötet werden, sollte man erwarten, dass auch der Gehalt der Zellen an energiereichen Phosphaten abnimmt. Bei diesen handelt es sich um Moleküle, die sowohl im Energiehaushalt der Zellen als auch als sogenannte second-messenger eine wichtige Rolle spielen. ATP entsteht bei der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien und dient als Energieressource bei vielen Zellvorgängen, z.B. bei der Aufrechterhaltung der Elektrolythomöostase oder auch bei der Kontraktion und Relaxation von Muskelfasern. Des weiteren spielt es als Transmitter und Kotransmitter an Nervenendigungen eine Rolle, sowie als Ausgangsstoff für die Synthese des second-messengers cAMP (Forth et al. 1992). GTP ist das Triphosphat des Guanosins und spielt vor allem als second messenger bzw. als Vorstufe zu deren Bildung eine Rolle im Zellstoffwechsel. Kreatinphosphat (CP) dient in den Zellen, vor allem in Muskelzellen, als Energiespeicher.

In Übereinstimmung mit den Resultaten aus der Kaliumbestimmung ist nach Ende der zweistündigen Inkubation der HMZ mit IAK nahezu kein CP, GTP oder ATP mehr in den Zellen vorhanden. Dies stellt einen weiteren Beweis für die These dar, dass die IAK unter Beteiligung des Komplementsystems zytotoxisch wirken.

Der Abfall der organischen Phosphate kann außerdem auch als Erklärung für die nachlassende Kontraktionsfrequenz unter dem Einfluss von IAK und Komplement herangezogen werden.

4.3.4. Trypanblau

Wenn wirklich ein Unterschied hinsichtlich der Zytotoxizität zwischen IAK und PNAk vorhanden sein sollte, worauf die Bestimmungen der biochemischen Parameter der Zytotoxizität übereinstimmend hinweisen, sollte dieser auch morphologisch nachzuvollziehen sein. Eine etablierte Methode zum lichtmikroskopischen Nachweis der Vitalität von Zellen ist die Trypanblauausschlussmethode (Patterson 1979, Philipps 1973). Sie beruht darauf, dass lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen, während tote gefärbt werden. Trypanblau besitzt eine höhere Affinität zu Serum- als zu Zellproteinen (Geschickter 1936, Phillips 1973). Deshalb ist es wichtig, die Zellen nach der Inkubation gründlich von Serumresten zu befreien.

Sowohl die Veränderung der noch am Boden haftenden Zellen als auch die deutlich höhere Anzahl der dem Monolayer aufliegenden abgerundeten Zellen spricht für die eine zytotoxische Wirkung der IAK. Dieser optische Befund erklärt auch, warum der erwartete Abfall der

Proteinmenge pro Kulturloch trotz Absterben der Zellen nicht eintritt. Die Zellen sterben zwar ab, lösen sich aber in den meisten Fällen nicht vom kollagenbeschichteten Untergrund.

4.3.5. Elektronenmikroskopie

Die im Vergleich zur Lichtmikroskopie deutlich höhere Auflösung bei der Elektronenmikroskopie erlaubt die optische Beurteilung nicht nur der Zellen als ganzes, sondern auch einzelner Zellorganellen. So sind die Mitochondrien mit ihren Matrixgranula sowie die Glanzstreifen deutlich zu erkennen. Zu Einzelheiten des Aufbaus der HMZ siehe 4.7.

Auch die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie beweisen die deutliche Zytotoxizität der IAK. Allerdings zeigt sich hier, dass auch die PNAk eine gewisse schädigende Wirkung auf die HMZ haben, die zu einem intrazellulären Ödem führt. Die Bedeutung dieser Beobachtung wird weiter unten (4.7) diskutiert.

4.4. Einfluss der PNAk im in-vitro-Modell eines xenogenen Systems bei Inkubation bis zu 24 Stunden

4.4.1. Chronischer Effekt von xenogenem Serum auf die Frequenz

Der positiv chronotrope Einfluss des XS, der direkt nach Zugabe des Serums einsetzt und vor allem von der Anwesenheit von PNAk im Serum abhängt (Klein 1994), ist nach zwei Stunden nicht mehr nachweisbar. Es handelt sich also um einen reversiblen Effekt. Das könnte zum einen daraus resultieren, dass Antikörper nach zwei Stunden nicht mehr auf den Zellen zu finden sind. Zum anderen ist es auch möglich, dass eine Adaptation der Zellen an die veränderten Bedingungen stattgefunden hat, die die chronotrope Wirkung aufhebt.

4.4.2. Chronischer Effekt von xenogenem Serum auf die Synchronizität des Schlagverhaltens

Die Tatsache, dass gegen Ende der 24stündigen Inkubation die Varianzen der Gruppe XS nicht mehr signifikant größer sind als die der anderen beiden Gruppen, beruht zum Teil auf einer steigenden Frequenzvarianz der letzteren.

Diese resultiert möglicherweise einerseits auf einem Verbrauch der metabolischen Substrate des Kultivierungsmediums und einer daraus resultierenden Arrhythmie. Unter anderem nimmt bei sinkendem pH, wie er im Medium nach längerer Inkubation auftritt, die „Offenwahr-

scheinlichkeit“ der für die Synchronisation entscheidenden Gap-junctions ab (Noma & Tsuboi 1987).

Andererseits nimmt die Dissoziation der Kontraktionen des mit XS inkubierten HMZ-Monolayers im Laufe der Zeit ab. Dies deutet darauf hin, dass die Wirkung des XS reversibel ist. Entweder verbraucht sich die für die Desynchronisation verantwortliche Serumkomponente (z.B. durch eine extrazelluläre Proteolyse), oder die HMZ werden gegen diese Wirkung resistent.

Absorption und Inaktivierung des XS schwächen den desynchronisierenden Einfluss ab. Folglich braucht man für diesen Effekt das Komplementsystem und/oder PNAk. Um dies genauer zu klären bedarf es der Untersuchung des Einflusses verschiedener Serumaufbereitungen.

4.4.3. Konzentrationsabhängigkeit

Mit zunehmender Verdünnung des Serums nimmt die Dissoziation der Zellen ab. Bei einer Verdünnung von 1:8 ist sie nicht mehr nachzuweisen. In dieser Verdünnung führen die PNAk auch nicht mehr zu einem intermediären Stillstand der HMZ (Klein 1994). Möglicherweise sind also auch für die Dissoziation wie für den vorübergehenden Stillstand der Zellen im wesentlichen die PNAk verantwortlich. Wenn dem so wäre, handelte es sich bei Dissoziation und Stillstand eventuell um zwei Aspekte des selben Phänomens. Um dies zu überprüfen werden verschiedene Serumaufbereitungen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Synchronizität der Kontraktionen untersucht.

4.4.4. Einfluss verschiedener Serumaufbereitungen

Die Kontraktionsfrequenzen der spontan schlagenden HMZ unterscheiden sich für die verschiedenen Gruppen nicht wesentlich voneinander. Dies entspricht den Erwartungen, die sich daraus ergeben, dass das XS nach zwei Stunden keine Frequenzänderung im Vergleich zur Kontrolle mehr hervorruft. Interessanterweise heben sowohl die Absorption der Antikörper als auch die Inaktivierung der Komplementfaktoren die dissoziationsfördernde Wirkung des XS Serums auf. Im Gegensatz dazu lässt sich der intermediäre Stillstand durch die Inaktivierung des Komplements nicht verhindern. Während also der intermediäre Stillstand im wesentlichen auf dem Einfluss der PNAk beruht, möglicherweise zusammen mit weiteren Serumfaktoren, sind für die Dissoziation der Kontraktionen der Zellen das Komplementsystem **und** die

PNAk von elementarer Bedeutung. Für die Dissoziation und den temporären Stillstand ist also vermutlich nicht ein und dasselbe Phänomen verantwortlich.

4.5. Einfluss der PNAk auf den Stickoxidstoffwechsel

4.5.1. HMZ und NO-Produktion

Stickoxid (NO) entspricht dem „endothelial derived relaxing factor“ und wird durch die Stickoxid-Synthase aus L-Arginin produziert. Die biologischen Effekte von Stickoxid werden zum Teil durch cGMP vermittelt, das durch Stimulation der Guanylatzyklase produziert wird (Kitakaze et al. 1995, Ebihara et al. 1996). Ähnlich wie die kardialen Nicht-Muskelzellen sind auch die HMZ zur NO-Produktion befähigt (Werdan et al. 1994).

Die Nitritproduktion kann mit Hilfe der Griess-Reaktion gemessen werden, da NO unter Zellkulturbedingungen in einem ziemlich stabilen Verhältnis zu gleichen Teilen zu Nitrat und Nitrit weiterreagiert (Werdan et al. 1994).

NO wirkt negativ inotrop, aber auch zytotoxisch (Kitakaze et al. 1995, Satoh et al. 1997). Die negative Inotropie wird möglicherweise über eine Abschwächung des Ca^{2+} -Transienten vermittelt (Ebihara et al. 1996). NO spielt vermutlich sowohl eine Rolle bei der Hypoxie von HMZ (Kitakaze et al. 1995) und dem Schutz des Herzens vor Sauerstoffradikalen (Maulik et al. 1996), als auch bei der Schädigung des Herzens durch bakterielle Endotoxine (Werdan et al. 1994) und bei der dilatativen Kardiomyopathie (Satoh et al. 1997).

4.5.2. Stickoxidproduktion in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration des XS

Nach Inkubation über 24 Stunden ist die Nitritproduktion der HMZ unter Inkubation mit XS deutlich größer als in der Kontrollgruppe. Die nach 24 Stunden Inkubation in den Kulturfläschchen vorhandene NO-Menge ist mit sinkender Konzentration von XS rückläufig. Die Tatsache, dass die NO-Zunahme erst nach zwölf Stunden zu verzeichnen ist, kann dadurch erklärt werden, dass die Transkription und Translation der induzierbaren Stickoxid-Synthase, die vermutlich der verstärkten NO-Produktion zugrunde liegt, mehrere Stunden benötigt. Während die konstitutiv in Kardiomyozyten exprimierte NO-Synthase nur geringe Mengen an NO bildet, führt die induzierbare NO-Synthase zu stark vermehrter NO-Freisetzung. Für einen definitiven Beweis einer Vermehrung der induzierbaren NO-Synthase bedarf es weiterer Untersuchungen.

Bei der Inkubation mit induzierten Antikörpern kann keine Veränderung im Nitritgehalt der Serum-Medium-Mischung festgestellt werden, was aufgrund der Tatsache, dass diese Antikörper schnell zytotoxisch wirken, erklärt ist.

4.6. Einfluss von Immunglobulinlösungen auf die HMZ

Die kommerziell vertriebenen Immunglobulinpräparate Intraglobin F und Pentaglobin sollten spezifische Antikörperwirkungen an den isolierten Kardiomyozyten zeitigen. Anders als mit den Spenderseren kommt es nicht zu einem passageren Kontraktionsstillstand. Jedoch resultiert die Inkubation mit Pentaglobin, das einen hohen Gehalt an PNAk hat (Hämagglutinationstiter 1:256), zu einer vermehrten Streuung der Messwerte der Kontraktionsparameter, analog zu den Ergebnissen mit xenoreaktivem humanem Serum. Intraglobin F dagegen führte zu keiner fassbaren Veränderung der Kontraktilität. Der Gehalt an präformierten Antikörpern gegen Ratte ist bei diesem Präparat sehr gering (Hämagglutinationstiter gegen Rattenerythrozyten 1:8). Es kommen mehrere Erklärungsmöglichkeiten in Frage:

1. Die Ak in den Immunglobulinlösungen sind wirkungslos oder durch das Aufbereitungs- und Reinigungsverfahren verändert.
2. Die im Versuch erreichte Ak-Konzentration ist zu niedrig.
3. Die Antikörper zeigen ein anderes Bindungsverhalten als diejenigen, die für die Versuche verwendet wurden.
4. Für die Wirkungen sind weitere Serumbestandteile notwendig.
5. Aufgrund der relativ geringen Stückzahlen könnte ein – im Vergleich zu den humanen Seren deutlich schwächerer Effekt – durch die Variabilität der Zellkulturpräparationen maskiert werden.

Zu 1. Gegen die Hypothese einer Wirkungslosigkeit spricht, dass Immunglobulinlösungen in einer Reihe von klinischen Anwendungen eingesetzt werden und wirksam sind. Dies gilt sowohl für Intraglobin F (Bitzan et al. 1993, Boger et al. 1993, Sheth et al. 1993, Haque et al. 1995) als auch Pentaglobin, das ein IgM-angereichertes Immunglobulin darstellt (Poynton et al. 1992, Pilz et al. 1994, Behre et al. 1995). Auch in der Xenotransplantationsforschung sind Immunglobuline erfolgreich eingesetzt worden, um die Überlebenszeit von Xenotransplantaten zu verlängern (Schussler et al. 1997). Ob andere Eigenschaften der Moleküle als die prototypisch immunologischen verändert sind, ist nicht genau untersucht.

Zu 2. Sowohl Pentaglobin als auch Intraglobin F enthalten 5g Plasmaprotein pro 100ml (>95% Immunglobuline), so dass die Endkonzentration im Kulturgefäß nicht zu niedrig sein sollte.

Zu 3. Nicht alle humanen Seren haben eine gleich starke Wirkung auf die HMZ. Diese Wirkung korreliert auch nicht in allen Fällen mit dem Hämagglutinationstiter (Zander 1994). Eine mögliche Erklärung könnte ein unterschiedliches Bindungsverhalten der Ak und damit die Abdeckung verschiedener Epitope oder ein unterschiedliches Verteilungsmuster der gebundenen Ak auf der Zelloberfläche sein. Da es sich bei Immunglobulinlösungen aber um gepoolte Ak von vielen Spendern handelt, sollten interindividuelle Unterschiede im Serumrepertoire weitgehend aufgehoben sein. Auch dieser Erklärungsversuch kann also das Ausbleiben von Veränderungen des Schlagverhaltens der HMZ nicht vollständig erklären.

Zu 4. Für die zytotoxische Wirkung der IAK ist die Aktivierung des Komplementsystems vonnöten. Auch ein erheblicher Teil der Wirkungen der PNAk wird durch Komplementfaktoren bestimmt oder zumindest verstärkt (siehe 4.7). Zusätzlich spielen bei der relativ unspezifischen „Isolierung“ der HMZ durch die PNAk möglicherweise weitere Serumbestandteile wie z.B. Proteine, die die Faltung der Antikörpermoleküle stabilisieren, eine Rolle. Durch die Aufbereitung der Immunglobulinpräparate sind so eventuell manche Eigenschaften der Moleküle verändert und manche Eigenschaften der nativen Seren nicht mehr vorhanden.

4.7. Überlegungen zum Wirkungsmechanismus der PNAk

Um die folgenden Überlegungen zum Wirkungsmechanismus der PNAk auf die HMZ verständlich zu machen, sollen zunächst einmal die Physiologie der HMZ im allgemeinen und der Kulturen aus HMZ neonataler Ratten im speziellen erläutert werden. Gestützt auf diese Grundlagen soll versucht werden, den PNAk und dem Komplementsystem anhand der oben dargestellten Ergebnisse ihre Rolle bei den beschriebenen Effekten zuzuordnen.

4.7.1. Physiologie der HMZ

4.7.1.1. Aufbau der HMZ und der HMZ-Kulturen

Der Herzmuskel stellt eine Sonderform der quergestreiften Muskulatur dar. Das Membransystem der HMZ besteht aus dem die Zellen außen umgebenden Sarkolemma und intrazellulären Membransystemen, im wesentlichen dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und den T-

Tubuli. Das SR entspricht einer spezialisierten Form des glatten endoplasmatischen Retikulums, das in allen Zellen vorkommt. Bei den T-Tubuli handelt es sich um tubuläre, quer zu den Myofibrillen verlaufende Einstülpungen der Zellmembran. Sie sind meist auf Höhe der Z-Streifen lokalisiert, die die Grenze zwischen je zwei Sarkomeren darstellen. Knapp 85% des Zellvolumens von erwachsenen HMZ werden von Myofibrillen und den meist in deren unmittelbarer Nähe liegenden, der Energieversorgung dienenden Mitochondrien eingenommen (Katz 1992). Neonatale HMZ zeichnen sich durch einen im Vergleich dazu prominenten Zellkern aus (Cohen & Lederer 1988). Die in HMZ besonders zahlreichen Mitochondrien sind von einer doppelten Membran umgeben. Die innere Oberfläche der Mitochondrien wird durch Cristae, das sind Einstülpungen der inneren Membran, vergrößert. In der Matrix der Mitochondrien kann man Matrixgranula, Elementarpartikel und Ribosomen finden (Bucher & Wartenberg 1997). In den HMZ-Kulturen lassen sich verschiedene Arten von HMZ unterscheiden. Neben Schrittmacherzellen finden sich vorhof- und ventrikelartige Zellen. Durch Kontakte der Zellen untereinander entsteht eine synchron pulsierende Einzelzellschicht, deren Kontraktionsfrequenz von den Schrittmacherzellen bestimmt wird (Schanne 1972, Werdan & Reithmann 1987). Die Ventrikelzellen sind dabei nicht selbst spontan aktiv (Schanne et al. 1990).

4.7.1.2. Das Aktionspotential der HMZ

Das Ruhemembranpotential neonataler Ratten-HMZ wird in der Literatur mit ca. -80 mV angegeben (Couch et al. 1969). Es wird durch die in der Diastole hohe K^+ -Permeabilität der Membran bestimmt. HMZ neonataler Ratten sind nicht schon bei Präparation spontan aktiv, sondern entwickeln den Automatismus erst in Kultur. Zumindest eine Ursache dafür ist ein Rückgang der K^+ -Leitfähigkeit, die zu einem Rückgang des Ruhemembranpotentials bis auf ca. -46 mV führt (Schanne et al. 1990). Mit Entstehung des Automatismus steigt auch der Membranwiderstand, der im wesentlichen die Summe der Leitfähigkeiten der einzelnen K^+ -Leitfähigkeiten widerspiegelt (Schanne et al. 1990).

Ein Ca^{2+} -Einstrom und ein Na^+ -Einstrom durch zwei verschiedene Kanäle sind für die Depolarisation der Zellen verantwortlich (Schanne et al. 1979). Bei Erreichen des Schwellenpotentials öffnen sich die Na^+ -Kanäle und ein schneller Na^+ -Einstrom löst die Depolarisation der Plasmamembran durch das Aktionspotential aus. Durch die Depolarisation werden außerdem spannungsabhängige K^+ -Kanäle geschlossen. Darauf folgt die Phase der frühen Repolarisation, die durch ein Ende des Na^+ -Einstroms, einen transienten K^+ -Ausstrom und einen kurz-

fristigen Chlorid-Einstrom gekennzeichnet ist. Die Plateauphase des Aktionspotentials, die länger als 100 Millisekunden dauert, entsteht durch einen langsamen Ca^{2+} -Einstrom. Die Repolarisation erfolgt durch den auswärtsgerichteten Gleichrichter, einen K^+ -Ausstrom aus der HMZ und ein Schließen der Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle. Einen verzögerten gleichrichtenden Strom gibt es in neonatalen Ventrikel-HMZ von Ratten Zellen nicht (Fermini & Schanne 1991).

Die Schrittmacheraktivität in den HMZ-Kulturen wird durch einen langsamen Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} bestimmt (Dudel & Trautwein 1958, Schanne et al. 1975, 1977).

Die myokardiale Kontraktilität hängt von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ab. Der Ca^{2+} -Anstieg in der HMZ entsteht zum einen durch einen schnellen transsarkolemmalen Einstrom von außen, zum anderen durch eine langsamere Freisetzung aus dem SR (Chin et al. 1990). Der transsarkolemmale Ca^{2+} -Einstrom hat in den HMZ fünf bedeutende Funktionen (Katz 1992):

1. die schon erwähnte Beteiligung an der Depolarisation und der Bestimmung der Plateauphase des Aktionspotentials;
2. eine Aktivierung von K^+ -Kanälen und damit eine Einleitung der Repolarisation;
3. die Bereitstellung von Ca^{2+} , das für spätere Kontraktionen im SR gespeichert wird;
4. die Auslösung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR, woher die für die elektromechanische Kopplung entscheidende Ca^{2+} -Menge kommt;
5. und schließlich bindet auch eine geringe Menge dieses Ca^{2+} direkt an das Troponin C.

Bei neonatalen HMZ sind die Kontraktionen stärker vom transsarkolemmalen Ca^{2+} -Einstrom abhängig als bei adulten HMZ. Das kann dadurch erklärt werden, dass die neonatalen HMZ weniger Ca^{2+} aus dem SR freisetzen als die adulten (Chin et al. 1990). Im Anschluss an die Kontraktion muss das Ca^{2+} gegen seinen Konzentrationsgradienten wieder aus der Zelle heraustransportiert werden. Dafür stehen zwei Pumpen zur Verfügung. Zum einen existiert eine ATP-abhängige Ca^{2+} -Pumpe, die vor allem in der Membran des SR vorkommt. Zum anderen gibt es einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, der ein Ca^{2+} -Ion im Austausch gegen drei Na^+ -Ionen aus der Zelle hinausbefördert und seine Energie über den von der Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhaltenen Na^+ -Gradienten bezieht. Dieser Austauscher hat die größere Kapazität (Katz 1992).

4.7.1.3. Die elektromechanische Kopplung und der Kontraktionsmechanismus

Die Kontraktion der Zellen wird durch die Hypothese der gleitenden Filamente erklärt. Diese besagt, dass die dünneren Aktin-Filamente durch die Myosin-Köpfe der dicken Filamente

zwischen diese gezogen werden. Myosin besteht im Herzmuskel aus zwei schweren und zweimal zwei leichten Proteinketten, kann in einen „Schwanz“ und einen „Kopf“ aufgeteilt werden und ist zur Hydrolyse von ATP fähig. Aktin ist ein globuläres Protein, das in den Filamenten als Polymer vorliegt, die ATPase des Myosin aktivieren kann und Bindungsstellen für die Myosinköpfe aufweist. Die Interaktion von Aktin- und Myosinfilamenten wird durch Tropomyosin und die Troponine (I, T und C) reguliert. Troponin T dient der Bindung des Troponinkomplexes an das Tropomyosin.

Die Kopplung von Erregung und mechanischer Kontraktion erfolgt durch Ca^{2+} , das vor allem aus dem SR freigesetzt wird. Die lokale Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration durch den trans-sarkolemmalen Einstrom führt zur Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR an der Grenze zu den T-Tubuli in sogenannten „sparks“ (Funken, Entladungen) (Cheng et al. 1996). Die Bindung des Ca^{2+} an Troponin C hebt den inhibierenden Effekt von Troponin I und Tropomyosin auf. Durch eine Änderung der Position dieser Regulationsproteine am Aktin werden dessen aktive Stellen einer Bindung durch die Myosinköpfe zugänglich (Katz 1992).

Die Kontraktionsfähigkeit der Muskelfibrillen ist auf die Anwesenheit von ATP angewiesen. In einem ersten Schritt erfolgt die Hydrolyse des myosin gebundenen ATP-Moleküls, bevor in Schritt zwei der aktive Aktin-Myosin-Komplex gebildet wird. Im dritten Schritt führt die Dissoziation der Hydrolyse-Produkte ADP und P_i vom Aktomyosin zu einer Konformationsänderung des Myosins und damit zur Kontraktion, die durch Ziehen der Aktin- zwischen die Myosinfilamente zustande kommt. Im vierten Schritt kommt es schließlich zur Dissoziation von Aktin und Myosin unter der Bindung von ATP an das Myosin. Der Prozess kann erneut ablaufen. Eine ATP-Verarmung führt zum Rigor, weil die ATP-Konzentration, die zur Ermöglichung der Dissoziation von Aktin und Myosin notwendig ist, größer ist als diejenige zur Substratstellen-Sättigung des Myosins. Es kommt also zu einer Bindung und Kontraktion, die nicht mehr aufgehoben werden kann.

ATP wird durch Glykolyse und oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette synthetisiert, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Dabei ist ATP nicht nur der wichtigste Energielieferant für viele Zellvorgänge, sondern dient auch als Vorstufe bei der Bildung von Second-Messenger-Molekülen (siehe auch 4.7.1.5). Die als energiereiche Phosphate oder auch bei der Bildung von Second-Messengern vorkommenden Moleküle Adenosin, Inosin und Guanosin sind die Verbindung der entsprechenden Purinnukleotide mit dem Zucker Ribose.

4.7.1.4. Kommunikation der Zellen untereinander

Die zytoplasmatischen Ausläufer zweier HMZ beginnen bei Kontakt, eine den Disci intercalati ähnliche Struktur zu bilden (Borisov 1991). Diese Disci intercalati entsprechen den lichtmikroskopisch sichtbaren Glanzstreifen, die für den Herzmuskel spezifisch sind und stets am Ort von Z-Streifen liegen (Bucher & Wartenberg 1997). Im Bereich dieser Disci intercalati finden sich im wesentlichen drei die Zellen verbindende Strukturen: die Fascia adhaerens, die Macula adhaerens und der Nexus, auch „gap-junction“ genannt. Während die beiden ersteren der mechanischen Verbindung der Zellen dienen, stellen die Gap-junctions Kanäle für die interzelluläre Kommunikation der Zellen dar. Der Herzmuskel ist kein tatsächliches, sondern nur ein funktionelles Synzytium. Daraus folgt: Die elektrische Erregung, welche die Depolarisation auslöst, muss von einer Zelle zur anderen transferiert werden. Dies geschieht über die Gap-junctions. Diese spezialisierten Proteinbereiche der Zellmembran sind besonders wichtig für die Synchronisation der Kontraktionen. Sie formen Kanäle, die für Ionen und Moleküle bis zu einer Größe von ca. 1 kD durchlässig sind (Saffitz 1992). Sie werden aus je sechs Connexin-Molekülen gebildet. Diese lagern sich zu einer Pore zusammen. Die Leitfähigkeit der Gap-junctions wird von folgenden Parametern bestimmt:

1. Sie nimmt ab, wenn die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration steigt und der pH sinkt (Noma & Tsuboi 1987). Das Schließen bei niedrigem pH wird durch das Connexin 43 geregelt, das als sogenanntes „gating particle“ fungiert (Ek-Vitorin et al. 1996);
2. Sie geht ebenfalls zurück, wenn ungesättigte Fettsäuren (inklusive Arachidonsäure) zunehmen (Aylsworth et al. 1986, Burt 1989). Arachidonsäure entkoppelt somit HMZ neonataler Ratten (Valiunas et al. 1997).
3. Die Phosphorylierung der Proteine der Gap-junctions fungiert ebenfalls als Regulationsmechanismus (Crow et al. 1990, Swenson et al. 1990).

4.7.1.5. Beeinflussung der HMZ durch verschiedene Regelkreise

Verschiedenste Stoffe haben einen Einfluss auf das Kontraktionsverhalten der HMZ. Hierzu zählen die Arachidonsäure-Derivate. Zu dieser wegen ihrer 20 Kohlenstoffatome nach dem griechischen Wort für zwanzig auch als Eikosanoide bezeichneten Gruppe gehören die Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene (Löffler & Petrides 1990). Prostaglandine verursachen eine Verminderung der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität und sind somit positiv inotrop. Prostazyklin wirkt in niedrigen Dosen positiv, in hohen negativ inotrop (Wagenknecht et al.

1989). Prostaglandin E_1 beeinflusst die Kontraktilität von HMZ positiv, $PGF_{2\alpha}$ hingegen negativ (Werdan et al. 1993).

Nach α_1 -adrenerger Stimulation der HMZ wird vermehrt Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in die Spaltprodukte Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert (Hanem et al. 1996). Dies geschieht durch eine phosphatidylinositolspezifische Phospholipase C, die über G-Proteine aktiviert wird. In der Folge steigt die Ca^{2+} -Affinität der entsprechenden Rezeptoren des kontraktilen Apparates. Außerdem wirkt IP_3 Ca^{2+} -mobilisierend (Werdan et al. 1994). DAG aktiviert die Proteinkinase C. In HMZ verursacht isoliertes DAG eine biphasische Antwort mit einer positiv inotropen Phase, die von einer negativ inotropen Phase gefolgt wird (Huang et al. 1996). IP_3 wird durch drei Phosphatasen zu Inositol verstoffwechselt. Für den Abbau von DAG existieren mehrere Wege: zu Phosphatidsäure, zu Glycerin und Fettsäuren oder zu Eikosanoiden (Stryer 1994).

Die kontraktilitätssteigernde Wirkung von β_1 -Adrenozeptor-Agonisten wird vom entsprechenden Rezeptor über G-Proteine und eine Aktivierung der Adenylatzyklase-Aktivität vermittelt (Mercadier et al. 1996). Es resultiert eine Vermehrung von cAMP. Das stimulierende G_s -Protein (guanylnucleotidbindendes Protein), das den Hormonrezeptor und die Adenylatzyklase koppelt, verstärkt die Antwort durch Vervielfachung. Am G-Protein resultiert aus einem Austausch von GDP durch GTP eine Dissoziation der α -Untereinheit, die die Adenylatzyklase aktiviert. Diese synthetisiert cAMP aus ATP unter der Abspaltung von Pyrophosphat und eines Wasserstoffions. Das cAMP aktiviert diverse Proteinkinasen und stimuliert u.a. die Phosphorylierung von Phospholamban durch die Proteinkinase A; dessen inhibierende Wirkung auf den Ca^{2+} -Transport wird dadurch aufgehoben. Auch andere Verbindungen (z.B. TNF oder reaktive Sauerstoffverbindungen) können in diese Regulationsmechanismen eingreifen (Werdan et al. 1991). Es resultiert eine positiv inotrope und lusitrope Beeinflussung der HMZ. Die Kontraktionsfrequenz von HMZ wird durch cAMP ebenfalls gesteigert (el-Ani et al. 1996). Das cAMP wird in der Zelle ständig durch eine Phosphodiesterase zu AMP und einem Wasserstoffion hydrolysiert.

Opiate und α_2 -adrenerge Hormone verursachen über G_i -Proteine eine vermehrte Hydrolyse von GTP und eine Verminderung der zellulären cAMP-Konzentration (Stryer 1994).

Eine Steigerung der ATP-Konzentration in der Zelle führt sowohl zu einer vermehrten Ca^{2+} -Freisetzung als auch Wiederaufnahme aus dem bzw. in das SR. Azidose hat negativ inotrope Auswirkungen.

4.7.2. Auswirkungen der PNAk und des Komplementsystems

Zur Erläuterung möglicher Wirkungsmechanismen der PNAk und des Komplementsystems sollen zuerst einmal die Ergebnisse früherer Untersuchungen (Klein 1994) zusammengefasst werden. Diese ergaben:

1. Nach Serumzugabe erfolgt zunächst eine teilweise enorme Zunahme der Frequenz.
2. Innerhalb kurzer Zeit kommt es dann zu einem reversiblen Stillstand der Zellen.
3. Durch Inaktivierung des Komplementsystems können weder die positiv chronotrope Wirkung des Serums noch der Stillstand verhindert werden.
4. Der Stillstand ist durch elektrische Stimulation der Zellen nicht zu verhindern.
5. Wenn das Serum verdünnt wird bzw. die Antikörper absorbiert werden, bleibt der Stillstand aus, die Frequenzsteigerung fällt geringer aus.
6. Die PNAk haben eine positiv „inotrope“ und positiv „lusitrope“ Wirkung auf die HMZ
7. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration während des Stillstandes ist gleichbleibend ca. $0,6 \mu\text{M}$, nach dem Stillstand sind die Ca^{2+} -Werte in der Zelle während der Relaxation höher als vor dem Stillstand. Der Stillstand lässt sich durch eine Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration verhindern.
8. Noch 10 bis 15 min. nach Beginn der Inkubation, also deutlich nach Ende des Stillstandes, haften die PNAk auf der Oberfläche der HMZ.
9. Direkt im Anschluss an den Stillstand schlagen die Zellen asynchron.

Im folgenden soll der Versuch unternommen werden, diese früheren Resultate und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in einem Modell der Wirkungsweise von PNAk und Komplement zu kombinieren.

4.7.2.1. Stillstand und Veränderung der Kontraktionsparameter

Der Stillstand wird am wahrscheinlichsten durch eine generelle Abnahme der Erregbarkeit der HMZ, nicht durch eine Hemmung spezifischer Ionenkanäle, verursacht. Versuche durch Prof. Koidl in Graz in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe, in denen das Membranpotential mit einer Patch-Elektrode gemessen wurde, brachten folgende Ergebnisse: Unter dem Einfluss des xenogenen Serums geht die Erregbarkeit von Herzventrikelzellen vom Meer-

schweinchchen zurück, der Eingangswiderstand erhöht sich. Die Bereitschaft der Zellen, auf Ströme zu reagieren, wie sie das sich ausbreitende Aktionspotential darstellt, wird geringer.

Man könnte vermuten, dass somit das Schwellenpotential für die Öffnung der schnellen Na^+ -Kanäle, die für die Fortleitung des Aktionspotentials notwendig ist, möglicherweise nicht erreicht wird. Nach Absorption der PNAk tritt dieser Effekt trotz Inkubation mit dem ansonsten gleichen Serum nicht mehr auf (Müller-Werdan et al. 1997).

Auch die positiv chronotrope Wirkung der PNAk wäre durch die Erhöhung des Membranwiderstandes erklärbar. Das Ohmsche Gesetz besagt, dass das Membranpotential E das Produkt aus dem Membranwiderstand R und dem fließenden Strom I ist ($E = R \cdot I$). Nach diesem Gesetz führt ein gleichbleibender langsamer Ca^{2+} -Einstrom, wie er bei der langsamen Depolarisation auftritt, bei erhöhtem Membranwiderstand zu einer größeren Potentialänderung. Da die Ionenströme durch einen höheren Membranwiderstand nicht behindert werden, wird also das Schwellenpotential in den Schrittmacherzellen schneller erreicht. Die Kontraktionsfrequenz steigt.

Als Erklärung für den Stillstand kann folgende Hypothese dienen: Wird die Erhöhung des Widerstandes durch Bindung weiterer PNAk zu groß, kann sich das Aktionspotential nicht mehr im Zellmonolayer ausbreiten. Es kommt zum Stillstand.

Dieses Modell einer vergleichsweise unspezifischen elektrischen Isolation der HMZ durch die PNAk erklärt auch, warum eine Dekomplementierung von XS keine signifikante Änderung des Eintretens und der Länge des Stillstands und der positiv chronotropen Wirkung bringt. Die Auswirkungen auf Inotropie und Lusitropie der HMZ könnten nach Absorption der PNAk möglicherweise deswegen geringer sein (Klein 1994), weil in Abwesenheit der PNAk keine oder weniger Komplementaktivierung stattfindet. Der MAC des Komplements alleine wirkt auf HMZ positiv inotrop, vermutlich über eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} sowie von DAG und IP_3 (Berger et al. 1993, siehe auch 4.4.4). „Inotropie“ und „Lusitropie“ bei der Inkubation mit XS werden also vermutlich über eine Komplementaktivierung durch die PNAk vermittelt. Auch die Erhöhung des basalen zytosolischen Ca^{2+} ist damit erklärbar.

Das spontane Wiederauftreten der Kontraktionen in den Zellkulturen wird unter Umständen durch diese Zunahme des intrazellulären Ca^{2+} verursacht. Diese Zunahme bewirkt eine Verschiebung des Membranpotentials hin zu positiveren Werten, also näher zum Schwellenpotential. Dadurch kann das Schwellenpotential trotz der Erhöhung des Membranwiderstandes erreicht werden. Da die Steigerung des extrazellulären Ca^{2+} über einen

erreicht werden. Da die Steigerung des extrazellulären Ca^{2+} über einen vergrößerten Konzentrationsgradienten auch einen verstärkten Ca^{2+} -Einstrom bedeutet, ist somit auch die Verhinderung des Stillstandes unter diesen Umständen erklärlich. Da die PNAk noch 10-15 min. nach Serumzugabe auf den HMZ nachweisbar waren, erscheint eine Entfernung der PNAk durch Endo- oder Exozytose als Ursache der Reversibilität des Stillstandes in diesem Zusammenhang nicht wahrscheinlich.

Auch die elektronenmikroskopische Untersuchung der Zellen nach der Inkubation mit PNAk deutet darauf hin, dass sich die PNAk nicht nur auf die Oberfläche der Zellen legen, sondern dass das XS auch Einflüsse auf das Innere der HMZ hat. Das beobachtete intrazelluläre Ödem passt gut zu einer sublytischen Komplementwirkung und einem resultierenden vermehrten Einstrom von Elektrolyten und Wasser in die Zellen.

4.7.2.2. Desynchronisation

Die Desynchronisation durch XS ist durch eine Störung der Erregungsausbreitung über den Monolayer zu erklären. Dafür kommen verschiedene Ursachen in Frage:

1. Eine Änderung der Zellform unter dem Einfluss von PNAk und Komplement wird für Endothelzellen beschrieben. Dies führt zu einer Lückenbildung im Zellrasen (Saadi et al. 94, Platt 1994). Für ein solches Verhalten der HMZ findet sich allerdings in der Elektronenmikroskopie kein Anhalt.
2. Eine unspezifische Erhöhung des Membranwiderstandes könnte nicht nur Ursache des temporären Stillstandes sein, sondern über eine erschwerte Ausbreitung des Aktionspotentials auch für die Desynchronisation verantwortlich sein. Gegen diese Hypothese spricht, dass eine Dekomplementierung des XS den Stillstand nicht verhindert, die Desynchronisation aber weitgehend aufhebt.
3. Auch ein Schließen der Gap-junctions würde die elektrische Entkopplung des Monolayers begründen. Dies könnte über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} - und Arachidonsäurekonzentration, sowie durch eine Phosphorylierung der Connexine durch von einer cAMP-Vermehrung aktivierte Proteinkinasen ausgelöst werden. All diese Phänomene können durch eine Integration des MAC in die Zellmembran verursacht werden. Zu dieser Theorie passt auch, dass noch 20 min nach Serumzugabe eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration festgestellt wurde (Klein 1994).

Der Hauptmechanismus der Beseitigung des MAC aus der Zellmembran bei neutrophilen Granulozyten (Morgan et al. 1987b, Morgan 1989), humanen Plättchen (Sims & Wiedmer 1986), humane Synovialzellen (Morgan et al. 1988a), Glomerulumzellen der Ratte (Camussi et al. 1987) und Ratten-Oligodendrozyten (Scolding et al. 1989b) ist endo- und exozytotische Vesikelbildung. HMZ sind grundsätzlich zur Endo- und Exozytose befähigt (Katz 1992). Die Endozytose anhaftender Antikörper könnte ein möglicher Mechanismus sein, über den die neonatalen Ratten-HMZ sich regenerieren. Andererseits könnten die Antikörper über eine extrazelluläre Verdauung durch zellständige Proteasen abgebaut werden. Daraus wäre dann der nach vielen Stunden einsetzende Rückgang der Desynchronisation möglicherweise zu erklären.

4.8. Vorschläge für weiterführende Arbeiten

Für weiterführende Arbeiten stellt sich eine Reihe interessanter Fragen:

- Lässt sich die Desynchronisation durch Stimulation von außen verhindern? Dies würde eine Mitwirkung der Gap-junctions als Mechanismus der Erregungsausbreitung von Zelle zu Zelle wahrscheinlicher machen.
- Lässt sich eine Desynchronisation auch durch aktiviertes Komplement ohne Ak auslösen?
- Ist die Konzentration von Ca^{2+} in den Zellen über längere Zeit als 20 min erhöht? Geht diese Erhöhung im Laufe der Zeit zurück?
- Steigt die cAMP-Konzentration oder die Konzentration von Arachidonsäure-Metaboliten in den Zellen nach der Gabe von XS an?
- Sind über längere Zeit ein oder mehrere MACs in der Zellmembran nachweisbar?
- An welchen Oberflächenstrukturen der neonatalen HMZ binden die PNAk genau?

5. Zusammenfassung

Fragestellung:

Die klinische Herz-Xenotransplantation scheint aufgrund vielfältiger wissenschaftlicher Fortschritte wahrscheinlicher zu werden, jedoch könnten präformierte natürliche Antikörper, die ohne vorausgegangene Sensibilisierung im Blut vorhanden sind und Antigene fremder Spezies erkennen, auch bei therapeutischer Bewältigung der initialen hyperakuten Abstoßungsreaktion zur anhaltenden Transplantatdysfunktion führen. Tage bis Wochen nach Antigenerstkontakt käme es im xenogenen System zusätzlich zur Bildung induzierter Antikörper, die gegen das Fremdgewebe gerichtet sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, an spontan kontrahierenden Kardiomyozyten das Wirkungsprofil präformierter natürlicher Antikörpern im Vergleich mit induzierten Antikörpern (durch Verimpfung von Rattenherzgewebe oder Rattenherzzellen in Kaninchen gewonnen) zu untersuchen.

Methodik:

Zu Kulturen spontan kontrahierender, neonataler Rattenkardiomyozyten werden Seren zugegeben, die präformierte oder induzierte Antikörper enthalten (dialysierte, Elektrolyt-, pH-, thermoäquilibrierte, mit Medium verdünnte Seren). Im Vergleich zu den nativen Seren werden dieselben Seren nach Entfernung der xenoreaktiven Antikörper aus den Seren (messbar durch den Hämagglutinationstiter gegen Rattenerythrozyten) und/oder Inaktivierung der Komplementkomponenten untersucht. Zum Einsatz kommt einerseits humanes Serum mit einem hohen Gehalt an präformierten xenoreaktiven Antikörpern; Spenderserum wird hierbei im Vergleich mit kommerziell erhältlichen Humanimmunglobulinpräparationen eingesetzt. Andererseits wird Serum mit einem hohen Gehalt an spezifischen induzierten Antikörpern gegen Rattenherzepitope in den Inkubationsexperimenten verwandt. Das Serum wurde nach Verimpfung von Rattenherzgewebe oder Rattenherzzellen in Kaninchen gewonnen.

Die Kontraktionen werden über ein Phasenkontrastmikroskop mittels eines photoelektrischen Systems registriert und videotechnisch dokumentiert. Als Parameter der Kontraktilität dienen die Frequenz, Amplitude und Kontraktions-/Relaxationsgeschwindigkeit. Das Ausmaß der synzytialen Kopplung im Zellverband wird als Streuung der Kontraktionsfrequenzen (Varia-

tionskoeffizienten, Tests nach Hartley, Mann-Whitney und Cochran, Scatterdiagramme) ermittelt. Als Zytotoxizitätsparameter werden der zelluläre Gehalt an Kalium und Protein sowie an energiereichen Phosphaten, die Trypanblauaufnahme und die elektronenmikroskopisch erfassbare Ultrastruktur bestimmt. Der Nitritgehalt des Kulturüberstands als Endprodukt des Stickoxidmetabolismus fungiert als ein Maß für die Zellaktivierung.

Ergebnisse:

(1) Spontane Zellkontraktionen neonataler Rattenkardiomyozyten kommen nach Gabe von Seren mit präformierten natürlichen Antikörpern - einem stereotypen, reproduzierbaren Muster eines geänderten Schlagverhaltens folgend - zu einem passageren Stillstand, der über einige Minuten anhält und spontan reversibel ist. Die Kontraktionen bleiben anschließend über Stunden desynchronisiert in Gegenwart der präformierten natürlichen Antikörper im Sinne einer Entkopplung des funktionellen Synzytiums der Zellmonolayer; dabei bleiben die Kardiomyozyten vital, jedoch kommt es zu einer Zellaktivierung, kenntlich an einer vermehrter zellulären Nitritproduktion. Absorption der spezifisch gegen Rattenepitope gerichteten xenoreaktiven Antikörper, nicht aber Dekomplementierung der Seren verhindert die Desynchronisation.

(2) Seren mit induzierten Antikörpern führen dagegen zeit- und konzentrationsabhängig zur Zytotoxizität bis zum Zelltod der neonatalen Rattenkardiomyozyten. Hierfür sind sowohl Komplementkomponenten als auch induzierte xenoreaktive Antikörper erforderlich.

Schlussfolgerungen:

Präformierte natürliche Antikörper könnten in vivo eine Dysfunktion xenogener Herztransplantate im Sinne einer fehlenden synzytialen Koordination der Kardiomyozyten auslösen. Induzierte Antikörper haben eine zytotoxische Wirkung, die die Zellintegrität gefährdet.

6. Literaturverzeichnis

1. Artrip JH, Itescu S, Minanov OP, Kwiatkowski PA, Michler RE: Cardiac xenotransplantation. *Curr. Opin. Cardiol.* 1997; 12: 172-178.
2. Astarcioglu I, Gugenheim J, Crafa F et al.: Hyperacute rejection of liver allografts in sensitized rats: Role of nonparenchymal liver cells. *Surg. Research* 1995; 58: 182-188.
3. Auchincloss H Jr.: Xenogeneic transplantation. A Review. *Transplantation* 1988; 46: 1-20.
4. Bach FH, Robson SC, Ferran C et al.: Xenotransplantation: Endothelial cell activation and beyond. *Transplant. Proc.* 1995; 27: 77-79.
5. Bach FH, Turman MA, Vercelotti GM et al.: Accommodation: A working paradigm for progressing toward clinical discordant xenografting. *Transplant. Proc.* 1991; 1: 205-207.
6. Baldwin WM III, Pruitt SK, Brauer RB, Daha MR, Sanfilippo F: Complement in organ transplantation: Contributions to inflammation, injury, and rejection. *Transplantation* 1995; 59: 797-808.
7. Behre G, Ostermann H, Schedel I et al.: Endotoxin concentrations and therapy with polyclonal IgM-enriched immunoglobulins in neutropenic cancer patients with sepsis syndrome: Pilot study and interim analysis of a randomized trial. *Antiinfect. Drugs Chemother.* 1995; 13: 129-134.
8. Berger HJ, Taratuska A, Smith TW et al: Activated complement directly modifies the performance of isolated heart muscle cells from guinea pig and rat. *Am. J. Physiol.* 1993; 265 (Heart Circ. Physiol. 34): H267-H272.
9. Bergmann R, Saumweber DM, Brecht HM et al.: Effects of a PAF-antagonist (WEB 2086) on hyperacute xenogeneic rejection in ex vivo perfused kidneys. *Transplant. Proc.* 1990; 22: 2009-10.
10. Bitzan M, Klemm M, Steffens R, Muller-Wiefel DE: Differences in verotoxin neutralizing activity of therapeutic immunoglobulins and sera from healthy controls. *Infection* 1993; 21: 140-145.
11. Boger RH, Bode-Boger SM, Fröhlich JC: Intravenöse Immunglobuline. Grundlagen, Auswahlkriterien und Indikationen für ihren prophylaktischen und therapeutischen Einsatz. *Med. Klin.* 1995; 90: 520-526.

12. Borisov AB: Myofibrillogenesis and reversible disassembly of myofibrils as adaptive reactions of cardiac muscle cells. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 1991; 599: 71-80.
13. Boyden SV: Natural Antibodies and the immune response. *Adv. Immunol.* 1966; 5: 1-28.
14. Braidley P, Aravot D, Hunter S et al.: Transgenic pigs - breakthrough in xenotransplantation. *Isr. J. Med. Sci.* 1996; 32: 795-8.
15. Brauer RB, Baldwin WM, Ibrahim S: The contribution of terminal complement components to acute and hyperacute allograft rejection in the rat. *Transplantation* 1995; 59: 288-293.
16. Bucher O, Wartenberg H: *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 12, vollst. überarbeitete Auflage, Huber 1997; Bern, Göttingen, Toronto, Seattle.
17. Calne RY: Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant. Proc.* 1970; 2: 550.
18. Campos L, Deli BC, Kern JH et al: Survival of MHC deficient mouse heterotopic cardiac allografts and xenografts. *Transplant. Proc.* 1995; 27: 254-255.
19. Carney DF, Lang TJ, Shin ML: Multiple signal messengers generated by terminal complement complexes and their role in terminal complement complex elimination. *J Immunol* 1990; 145: 623-629.
20. Casali P, Notkins AL: CD5⁺B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol. Today* 1989; 10/11: 364-368.
21. Casali P, Schettino EW: Structure and function of natural antibodies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996; 210: 167-79.
22. Cheng H, Lederer MR, Xiao RP et al.: Excitation-contraction coupling in heart: new insights from Ca²⁺ sparks. *Cell Calcium* 1996; 20: 129-40.
23. Chin TK, Friedman WF, Klitzner TS: Developmental changes in cardiac myocyte calcium regulation. *Circ. Res.* 1990; 67: 574-579.
24. Cohen NM, Lederer WJ: Changes in the calcium current of rat heart ventricular myocytes during development. *J. Physiol.* 1988; 406: 115-146.
25. Cooper DKC: Clinical Xenotransplantation – how close are we? *Lancet* 2003; 362:557-59.

26. Cooper DKC, Gollackner B, Knosalla C, Teranishi K: Xenotransplantation – how far have we come? *Transplant Immunol.* 2002; 9: 251-256.
27. Cooper DKC, Koren E, Oriol R: Oligosaccharides and discordant xenotransplantation. *Immunol. Rev.* 1994; 141:31-58.
28. Couch JR, West O, Hoff HE: Development of the action potential of the prenatal rat heart. *Circ. Res.* 1969; 24: 19-31.
29. Cozzi E, Langford GA, Wright L et al.: Comparative analysis of human DAF expression in the tissues of transgenic pigs and man. *Transplant. Proc.* 1995; 27: 319-320.
30. Cozzi E, White DJ: The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat. Med.* 1995; 1: 964-966.
31. Cybulsky AV, Bonventre JV, Quigg RJ et al.: Cytosolic calcium and protein kinase C reduce complement-mediated glomerular epithelial injury. *Kidney Int.* 1990; 38: 803-811.
32. Dalmaso AP, Vercellotti GM, Platt JL et al.: Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay accelerating factor. *Transplantation* 1991; 52: 530-533.
33. Dalmaso AP, Platt JL: C1 inhibitor prevents complement-mediated activation of xenogenetic endothelial cells in an in-vitro model of xenograft hyperacute rejection. *Transplantation* 1993; 56: 1171.
34. DeWitt CW: Immunologic Aspects of cross-species transplantation. *Transplant. Proc.* 1970; 2: 468-476.
35. Drude L, Wiemers F, Maisch B: Impaired myocyte function in vitro incubated with sera from patients with myocarditis. *Eur. Heart J.* 1991; 12 (Supplement D): 36-38.
36. Dudel J, Trautwein W: Der Mechanismus der automatischen, rhythmischen Impulsbildung der Herzmuskelfaser. *Pflügers Arch.* 1958. 267: 553-558.
37. Dunning JJ, White DJG, Wallwork J: The rationale for xenotransplantation as a solution to the donor organ shortage. *Pathologie Biologie* 1994; 42: 231-235.
38. Ebihara Y, Haist JV, Karmazyn M: Modulation of endothelin-1 effects on rat hearts and cardiomyocytes by nitric oxide and 8-bromo cyclic GMP. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1996; 28: 265-277.

39. Ek-Vitorin JF, Calero G, Morley GE, Coombs W, Taffet SM, Delmar M: PH regulation of connexin43: molecular analysis of the gating particle. *Biophys. J.* 1996; 71: 1273-84.
40. El-Ani D, Jacobson KA, Shainberg A: Effects of theophylline and dibutyryl-cAMP on adenosine receptors and heart rate in cultured cardiocytes. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 1996; 7: 347-62.
41. Fabre, JW: Nudging xenotransplantation towards humans. *Nat. Med.* 1995; 1: 403-404.
42. Fermini B, Schanne OF: Determinants of action potential duration in neonatal rat ventricle cells. *Cardiovasc. Res.* 1991; 25: 235-243.
43. Fischel RJ, Bolman RM III, Platt JL et al.: Removal of IgM anti-endothelial antibodies results in prolonged cardiac xenograft survival. *Transplant. Proc.* 1990; 22: 1077-1078.
44. Fodor WL, Williams BL, Matis LA et al.: Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 11153-7.
45. Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (Hrsg.): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 6., völlig neu bearbeitete Auflage; BI-Wiss.-Verl., Mannheim; Leipzig; Wien; Zürich; 1992.
46. Fries LF, Frank MM: Molecular basis of complement action. In: *The molecular basis of blood disease*. Ed.: Stamatogannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majerus PW. Philadelphia, PA: Saunders 1987; 450-498.
47. Galili U, Clark MR, Shohet SB et al.: Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal α 1-3Gal epitope in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 1369.
48. Galili U, Swanson K: Gene sequences suggest inactivation of a α -1,3-galactosyl-transferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 7401.
49. Galili U: Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha-galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans: *Immunol. Today*. 1993; 14: 480-2.
50. Galili U: The α -gal epitope (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation. *Biochimie* 2001; 83: 557-563.

51. Garzelli C, Incaprera M, Bazzichi A, Manunta M, Rognini F, Falcone G: Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes produce natural antibodies to histones. *Immunol. Lett.* 1994; 39: 277-282.
52. Geschickter CF: *Stain Technol.* 1936; 5: 49.
53. Gewurz H, Clark DS, Cooper MD et al.: Effect of cobra venom-induced inhibition of complement activity on allograft and xenograft rejection reactions. *Transplantation* 1967; 5: 1296-1303.
54. Gianello P: Élimination des anticorps naturels dans les xénogreffes discordantes. *Pathologie Biologie* 1994; 42: 225-229.
55. Gustafsson K, Strahan K, Preece A: α 1,3galactosyltransferase: A target for in vivo genetic manipulation in xenotransplantation. *Immunol. Rev.* 1994; 141: 59-70.
56. Hammer C: Xenografts: Do they have a future? In: Gurland HJ, Moran J, Wetzels E (eds.): *Immunologic perspectives in chronic renal failure. Contrib. Nephrol. Basel, Karger* 1990; 86: 165-179.
57. Hammer C, Chaussy Ch, Brendel W: Preformed Natural Antibodies in animals and man. *Eur. Surg. Res.* 1973; 5: 162-166.
58. Hammer C, Csapo C, Höbel G, Müller U, Werdan K: Preformed Natural Antibodies: Action on endothelial cells. *Transplant. Proc.* 1992b; 24: 590-591.
59. Hammer C, Hingerle M: Development of Preformed Natural Antibodies in gnotobiotic dogs and pigs, impact of food antigens on antibody specificity. *Transplant. Proc.* 1992; 24: 707-709.
60. Hammer C: Fundamental problems of xenotransplantation. *Pathologie Biologie* 1994; 42: 203-207.
61. Hammer C: Hat die Transplantation von Tierorganen Zukunft? *Einsichten. Forschung an der Ludwig-Maximilians-Universität München, EOS Verlag St. Ottilien* 1992a; 34-37.
62. Hammer C: Isohemagglutinins and Preformed Natural Antibodies in xenogeneic organ transplantation. *Transplant. Proc.* 1987; 19: 4443-4447.
63. Hammer C: Possible role of antibodies in xenogeneic rejection. *Annual of Cardiac Surgery* 1993; 172-179.

64. Hammer C: Preformed Natural Antibodies (PNAB) and possibilities of modulation of Hyperacute Xenogeneic Rejection (HXAR). *Transplant. Proc.* 1989; 21: 522-523.
65. Hammer C: Xenografting: Its future role in clinical organ transplantation. In: Land W, Dossetor JB (Eds.): *Organ replacement therapy: Ethics, justice and commerce.* 1991: 512-518; Springer Verlag Berlin Heidelberg.
66. Hammer C: Xenotransplantation. Kann sie halten, was sie verspricht? *Deutsches Ärzteblatt* 1995; 92: B99-103.
67. Hammer C: Xenotransplantation: The good, the bad and the ugly or how far are we to clinical application? *Transplant. Proc.* 2003; 35: 1256-1257.
68. Hammer C, Thein E: *Physiological aspects of xenotransplantation*, 2001. *Xenotransplantation* 2002; 9: 303-305.
69. Hanem S, Enger M, Skomedal T, Osnes JB: Inositol-1,4,5-trisphosphate mass content in isolated perfused rat heart during alpha-1-adrenoceptor stimulation. *Mol. Cell. Biochem.* 1996; 163-164: 167-72.
70. Hansch GM, Betz M, Gunther J et al.: The complement membrane attack complex stimulates the prostanoid production of cultured glomerular epithelial cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1988; 85: 87-93.
71. Haque KN, Remo C, Bahakim H: Comparison of two types of intravenous immunoglobulins in the treatment of neonatal sepsis. *Clin. Exp. Immunol.* 1995; 101: 328.
72. Hardy RR: CD5 B cells: A separate lineage at last? *Curr. Biol* 1991; 1: 290-292.
73. Herberman RB: Potential role of natural antibodies in resistance to tumor growth: *Nat. Immun.* 1995 Jan-Feb; 14: 1.
74. Houssin D: Le remplacement d'organes aux limites du vivant: La xénogreffe. *Pathologie Biologie* 1994; 42: 202.
75. Huang XP, Sreekumar R, Patel JR, Walker JW: Response of cardiac myocytes to a ramp increase of diacylglycerol generated by photolysis of a novel caged diacylglycerol. *Biophys. J.* 1996; 70: 2448-57.
76. Johnston PS, Lim SML, Wang MW et al.: Hyperacute Rejection of Xenografts in the complete absence of antibody. *Transplant. Proc.* 1991; 23: 877-879.

77. Kaplon RJ, Platt JL, Kwiatkowski PA et al.: Absence of hyperacute rejection in pig-to-primate orthotopic pulmonary xenografts. *Transplantation* 1995a; 59: 410-416.
78. Kaplon RJ, Michler RE, Xu H, Kwiatkowski PA, Edwards NM, Platt JL: Absence of hyperacute rejection in newborn pig-to-baboon cardiac xenografts. *Transplantation*. 1995b; 59: 1-6.
79. Kasian MT, Ikematsu H, Casali P: CD5+ B-lymphocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1991; 197: 226-241.
80. Katz AM: *Physiology of the heart*. Second edition 1992. Raven Press New York.
81. Kemp E, Dieperink H, Leth P et al: Monoclonal antibodies to complement c3 prolong survival of discordant xenografts: guinea pig heart to rat transplantation. *Transplant. Proc.* 1994; 26: 1011-1015.
82. Kitakaze M, Node K, Komamura K et al.: Evidence for nitric oxide generation in the cardiomyocytes: Its augmentation by hypoxia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1995; 27: 2149-2154.
83. Klein D, Müller U, Zander M, Werdan K, Hammer C: Die Wirkung von Präformierten Natürlichen Antikörpern (PNAK) auf schlagende Herzmuskelzellkulturen von neonatalen Ratten. *Chirurgisches Forum 1994 für experimentelle und klinische Forschung*; 157-162.
84. Klein D: Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von präformierten natürlichen Antikörpern (PNAk) an kultivierten schlagenden Herzmuskelzellen. *Diss. LMU München* 1994.
85. Koski CL, Ramm LE, Hammer CH et al.: Cytolysis of nucleated cells by complement: Cell death displays multi-hit characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983; 80: 3816-3820.
86. Kroshus TJ, Bolman RM 3rd, Dalmaso AP: Selective IgM depletion prolongs organ survival in an ex vivo model of pig-to-human xenotransplantation. *Transplantation* 1996; 62: 5-12.
87. Lachmann PJ: The control of homologous lysis. *Immunol. Today* 1991; 12: 312-315.
88. Lanza RP, Cooper DKC, Chick WL: Xenotransplantation. After struggling for decades with a shortage of donated organs from cadavers, transplant surgeons may soon have another source to tap. *Scientific American* 1997; July: 40-45.

89. Latif N, Rose ML, Yacoub MH et al.: Association of pretransplantation antiheart antibodies with clinical course after heart transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* 1995; 14: 119-126.
90. Latinne D, Soares M, Havaux X et al.: Depletion of IgM xenoreactive natural antibodies by injection of anti- μ monoclonal antibodies. *Immunol. Rev.* 1994; 141: 95-125.
91. Leventhal JR, Dalmaso AP, Cromwell JW et al.: Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation* 1993; 55: 857.
92. Lexer G, Cooper DKC, Rose AG et al.: Hyperacute rejection in a discordant (pig to baboon) cardiac xenograft model. *J. Heart Transplant.* 1986; 5: 411-418.
93. Lillevang ST, Steinbrüchel DA, Kemp E: Detection of rat antibodies against hamster heart: Reactivity of Natural Antibodies in a concordant model. *Transplant. Proc.* 1994; 26: 989-991.
94. Lindman BJ, Noreen HJ, Geller RL et al.: The role of cell-surface glycoproteins in the activation of endothelial cells by antibody and complement. *Transplant. Proc.* 1992; 24: 586-587.
95. Linn BS, Jensen JA, Portal P: Renal xenograft prolongation by suppression of Natural Antibody. *J. Surg. Res.* 1968; 8: 211-213.
96. Löffler G, Petrides PE: *Physiologische Chemie*. Erster korrigierter Nachdruck der vierten überarbeiteten und erweiterten Auflage. Springer 1990; Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
97. Lo TN, Boyle MDP: Relationship between the intracellular cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate level of tumor cells and their sensitivity to killing by antibody and complement. *Cancer Res.* 1972; 39: 3156.
98. Lu CY, Khair-El-Din TA, Dawidson IA et al: Xenotransplantation. *FASEB J.* 1994; 8: 1122-1130.
99. Maulik N, Engelman DT, Watanabe M et al.: Nitric oxide/carbon monoxide. A molecular switch for myocardial preservation during ischemia. *Circulation* 1996; 94(9 Suppl); II398-406.

100. McCurry KR, Kooyman DL, Alvarado CG et al.: Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat. Med.* 1995; 1: 423-427.
101. McKenzie IFC, Osman N, Cohney S, Sandrin MS: Strategies to overcome hyperacute rejection of pig-to-human xenografts. *Transplant. Proc.* 1997; 29: 973-974.
102. Mercadier JJ, Espinasse I, Iourgenko V: Transduction du signal beta-adrenergique et adenylate cyclases cardiaques. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1996; 190: 207-18.
103. Millan MT, Ferran C, Winkler H et al: Xenotransplantation: Problems and approaches. *Transplant. Proc.* 1994; 26: 3593-3596.
104. Minanov OP; Itescu S; Michler RE: Recent advances and the potential for clinical use of xenotransplantation. *Curr. Opin. Cardiol.* 1996; 11: 214-20.
105. Miyagawa S, Hirose H, Shirakura R et al.: The mechanism of discordant xenograft rejection. *Transplantation* 1988; 46: 825-830.
106. Miyata Y, Platt JL: Xeno-still stuck without α Gal. *Nat. biotechnol.* 2003; 21: 359-360.
107. Moberg AW, Shons AR, Gewurz H et al.: Prolongation of renal xenografts by the simultaneous sequestration of preformed antibody, inhibition of complement, coagulation and antibody synthesis. *Transplant. Proc.* 1971; 3: 538-541.
108. Morgan BP: Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem. J.* 1989; 264: 1-14.
109. Morschheuser T, Steinhoff G, Indzhia L et al.: Successful down-regulation of natural and xenoreactive antibodies in pig-to-baboon xenotransplantation by high-dose cyclophosphamide. *Transplant. Proc.* 1997; 29: 970-2.
110. Müller U, Klein D, Zander M, Werdan K, Hammer C: Preformed Natural Antibodies: Their impact on beating neonatal rat cardiomyocytes. *Transplant. Proc.* 1994; 26: 1000-1002.
111. Müller-Werdan U, Klein D, Zander M, Werdan K, Hammer C: Beating neonatal rat cardiomyocytes as a model to study the role of Xenoreactive Natural Antibodies in Xenotransplantation. *Transplantation* 1994; 58: 1403-1409.
112. Müller-Werdan U, Koidl B, Autenrieth A, Klein D, Werdan K, Hammer C: In-vitro-Modell der Abstoßungsreaktion bei Herz-Xenotransplantation: Präformierte natürliche An-

- tikörper führen anders als induzierte Antikörper zu einer nicht-zytotoxischen Kardiomyozyten-Dysfunktion. *Intensivmed* 1997; 34(6): P5.
113. Najarian JS: Overview of in vivo xenotransplantation studies: prospect for the future. *Transplant. Proc.* 1992; 24:733-738.
 114. Naziruddin B, Shiroki R, Shishido S, Howard T, Mohanakumar T: Biochemical and functional characterization of xenoreactive natural antibodies in hu-PBL-SCID mice. *J. Clin. Invest.* 1996; 97: 1267-75.
 115. Noma A, Tsuboi N: Dependence of junctional conductance on proton, calcium and magnesium ions in cardiac paired cells of guinea-pig. *J. Physiol.* 1987; 382:193-211.
 116. Oglesby TJ, Allen CJ, Liszewski MK et al.: Membrane cofactor protein (CD46) protects cells from complement-mediated attack by an intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* 1992; 175: 1547-1551.
 117. Oriol R, Barthod F, Bergemer A-M et al: Monomorphic and polymorphic carbohydrate antigens on pig tissues: Implications for organ xenotransplantation in the pig-to-man model. *Transpl. Int.* 1994; 7: 405-413.
 118. Parker W, Bruno D, Platt JL: Xenoreactive natural antibodies in the world of natural antibodies: typical or unique? *Transpl. Immunol.* 1995; 3: 181-91.
 119. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA: Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med.* 1997; 3: 282-286.
 120. Patterson MK jr.: Measurement of growth and viability. In: Jakoby W.B., Pastan I.H. (eds.): *Methods in Enzymology, Volume LVIII, Cell Culture* 1979: 151-152; Academic Press New York.
 121. Phelps CJ, Koike C, Vaught TD et al.: Production of α 1,3-Galactosyltransferase deficient pigs. *Science* 2003; 299: 411-414.
 122. Phillips HJ: Dye exclusion tests for cell viability. In: Kruse P.F. jr., Patterson M.K. jr.: *Tissue culture. Methods and applications.* 1973: 406-408; Academic Press New York.
 123. Pilz G, Kreuzer E, Kääb S, Appel R, Werdan K: Early sepsis treatment with immunoglobulins after cardiac surgery in score-identified high-risk patients. *Chest* 1994; 105: 76-82.

124. Platt JL, Bach FH: The barrier to xenotransplantation. *Transplantation* 1991; 52: 937-947.
125. Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ et al.: Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation* 1991c; 52: 214.
126. Platt JL, Lindman BJ, Bach FH: Natural Antibody targets on discordant endothelium: Molecular characterization and consequences of antibody binding. *Transplant. Proc.* 1991b; 23: 815-816.
127. Platt JL, Lindman BJ, Chen H et al.: Endothelial cell antigens recognized by xenoreactive human natural antibodies. *Transplantation* 1990b; 50: 817-822.
128. Platt JL, Lindman BJ, Geller RL et al.: The role of natural antibodies in the activation of xenogeneic endothelial cells. *Transplantation* 1991a; 52: 1037-1043.
129. Platt JL, Vercellotti GM, Dalmaso AP et al.: Transplantation of discordant xenografts: a review of progress. *Immunol. Today* 1990a; 11: 450-457.
130. Platt JL: A perspective on xenograft rejection and accommodation. *Immunol. Rev.* 1994; 141:127-149.
131. Platt JL: Xenotransplantation: recent progress and current perspectives. *Curr. Opin. Immunol.* 1996; 8: 721-728.
132. Platt JL: The immunological hurdles to cardiac xenotransplantation. *J. Card. Surg.* 2001; 16:439-47.
133. Platt JL: Genetic modification of xenografts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2003; 278: 1-21.
134. Platt JL: New risks, new gains. *Nature* 2000; 407: 27-30.
135. Platts-Mills TAE, Ishizaka K: Activation of the alternative pathway of human complement by rabbit cells. *J. Immunol.* 1974; 113: 348-357.
136. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD et al.: Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000; 407: 86-90.
137. Poncet P, Matthes T, Billecocq A et al.: Immunochemical studies of polyspecific natural autoantibodies: Charge, lipid reactivity, Fab₂' fragments activity and complement fixation. *Mol. Immunol.* 1988; 25: 981-989.

138. Pourcel C, Charreau B, Lemauff B et al.: Xenotransplantation: the state of the art. *M S Medecine-Sciences* Mar 1997; 13: 301-311.
139. Poynton CH, Jackson S, Fegan C et al.: Use of IgM enriched intravenous immunoglobulin (Pentaglobin) in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1992; 9: 451-457.
140. Pozzetto U, Citterio F, Caizzi MP et al.: Humoral immune reactions to pig antigens in humans. *Transplant. Proc.* 1990; 22: 2200-2201.
141. Pruitt SK, Baldwin WM, Barth RN et al.: The effect of xenoreactive antibody and B cell depletion on hyperacute rejection of guinea pig-to-rat cardiac xenografts. *Transplantation* 1993; 56: 1318-1324.
142. Reemtsma K, McCracken BH, Schlegel JU et al.: Renal heterotransplantation in man. *Ann. Surg.* 1964; 160: 384-405.
143. Richards FF, Konigsberg WH, Rosenstein RW et al.: On the specificity of antibodies. Biochemical and biophysical evidence indicates the existence of polyfunctional antibody combining regions. *Science* 1975; 187: 130-137.
144. Roitt IM, Brostoff J, Male DK: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*; dritte neubearbeitete Auflage 1995; Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
145. Rosenberg JC, Hawkins E, Rector F: Mechanisms of immunological injury during antibody-mediated hyperacute rejection of renal heterografts. *Transplantation* 1971; 11: 151-157.
146. Rosengard AM, Cary N, Horsley J et al.: Endothelial expression of human decay accelerating factor in transgenic pig tissue: a potential approach for human complement inactivation in discordant xenografts. *Transplant. Proc.* 1995; 27: 326.
147. Sachs L: *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden*. 7., völlig neubearbeitete Auflage 1992; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
148. Saffitz JE, Hoyt RH, Luke RA et al.: Cardiac Myocyte Interconnections at gap junctions. Role in normal and abnormal electrical conduction. *Trends Cardiovasc. Med.* 1992; 2: 56-60.
149. Sakai A, Kountz SL: Dissociation of humoral and cellular immune reactions of the rabbit, guinea pig and dog kidney xenografts in the rat. *J. of Surg. Res.* 1976; 21: 159-168.

150. Samuelsson BE, Rydberg L, Breimer ME et al: Natural Antibodies and human xenotransplantation. *Immunol. Rev.* 1994; 141: 151-168.
151. Sandrin MS, McKenzie IFC: Gal α (1,3)Gal, the major xenoantigen(s) recognised in pigs by human natural antibodies. *Immuno. Rev.* 1994; 141: 169-190.
152. Sandrin MS, Vaughan HA, Dabkowski PL, McKenzie IF: Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal(alpha 1-3)Gal epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 1993; 90: 11391-5.
153. Sanfilippo F, Baldwin WM: Antibody and complement in graft rejection. *Transplant. Proc* 1997; 29: 179-180.
154. Satake M, Kumagai-Braesch M, Kawagishi N et al.: Xenorecognition and xenoreactivity. *Pathologie Biologie* 1994; 42: 209-212.
155. Satoh M; Nakamura M; Tamura G et al.: Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in myocardium in human dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll.Cardiol.* 1997; 29: 716-24.
156. Saumweber DM, Bergmann R, Hammer C et al.: Studies comparing xenogeneic rejection mechanisms of pig, baboon, and human kidneys. *Transplant. Proc.* 1992; 24: 576-577.
157. Sawyer GJ, Gustafsson K, Fabre JW: Vascularised mouse-to-rat heart grafts: An unexpectedly difficult model of xenotransplantation. *Transplant. Proc.* 1995; 27: 309.
158. Schanne OF, Lefloch M, Fermini B et al.: Membrane resistance increases when automaticity develops in explanted rat heart cells. *Am. J. Physiol.* 258 (Heart Circ. Physiol. 27); 1990: H145-H152.
159. Schanne OF, Rivard C, Doyon G: Ionic determinants of spontaneous activity in clusters of cultured cardiac cells from newborn rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1975; 53: 1209-1213.
160. Schanne OF, Ruiz-Geretti E, Payet MD et al.: Influence of Varied $[Ca^{2+}]_0$ and $[Na^+]_0$ on electrical activity of clusters of cultured cardiac cells from neonatal rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1979; 11: 477-484.
161. Schanne OF, Ruiz-Geretti E, Rivard C et al.: Determinants of electrical activity in clusters of cultured cardiac cells from neonatal rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1977; 9: 269-283.

162. Schanne OF: Factors involved in the loss of spontaneous contractile and electrical activity in clusters of cultured cardiac cells. *Can J. Physiol. Pharmacol.* 1972; 50: 523-532.
163. Schmöckel M, Nollert G, Shahmohammadi M et al.: Prevention of hyperacute rejection by human decay accelerating factor in xenogeneic perfused working hearts. *Transplantation* 1996; 6: 729-734.
164. Schumacher I, Jeevarathnam S, Rubbocki R et al.: Use of gene therapy to induce antigen-specific immunologic unresponsiveness to class I xenogeneic major histocompatibility complex antigens. *Transplant. Proc.* 1995; 27: 313-314.
165. Schussler O, Latremouille C, Genevaz D, Carpentier A, Glotz D: Normal human polyclonal immunoglobulins for intravenous use contain anti-idiotypes against natural xenophile antibodies and prolong discordant xenograft survival. *Transplant. Proc.* 1997; 29: 959-960.
166. Sheil AGR: Ethics in organ transplantation: The major issues. *Transplant. Proc.* 1995; 27: 87-89.
167. Sheth KV, Al Sedairy S, Lee J: Effectiveness of four intravenous IgG preparations in prevention of phagocytosis of anti-Rh-(D)-coated erythrocytes by mononuclear phagocytes. *Vox Sang.* 1993; 65: 190-193.
168. Specke V, Denner J.: Porcine endogene Retroviren (PERVs) und Xenotransplantation. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2003; 128:1301-1306.
169. Spiro RG, Bhoyroo VD: Occurrence of α -D-galactosyl residues in the thyroglobulins from several species - localization in the saccharide chains of the complex carbohydrate units. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 9859.
170. Starzl TE, Valdivia LA, Murase N et al: The biological basis of and strategies for clinical xenotransplantation. *Immunol. Rev.* 1994; 141: 213-244.
171. Steinbrüchel DA, Nielsen B, Kemp E: Treatment strategies of hamster-to-rat cardiac xenotransplantation. *Transplant. Proc.* 1994; 26: 1039-1041.
172. Stryer L: Biochemie, Zweiter korrigierter Nachdruck d. völlig neu bearb. Auflage von 1990; Spektrum Akademischer Verlag 1994; Heidelberg, Berlin, Oxford.
173. Sykes M, Lee LA, Sachs DH: Xenograft tolerance. *Immunol. Rev.* 1994; 141: 245-276.

174. Tanaka M, Murase N, Miyazawa H et al.: Effect of anticomplement agent k-76 COOH in hamster-to-rat and guinea pig-to-rat xenotransplantation. *Transplant. Proc.* 1995; 27: 275-276.
175. Turano A, Balsari A, Viani E et al.: Natural human antibodies to gamma interferon interfere with the immunomodulating activity of the lymphokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 4447-51.
176. Turman MA, Casali P, Notkins AL et al.: Polyreactivity and antigen specificity of human xenoreactive monoclonal and serum natural antibodies. *Transplantation* 1991; 52: 710-717.
177. Ueki Y, Goldfarb IS, Harindranath N et al.: Clonal analysis of a human antibody response. Quantitation of precursors of antibody-producing cells and generation and characterization of monoclonal IgM, IgG, and IgA to rabies virus. *J. Exp. Med.* 1990; 171: 19-34.
178. Valdivia LA, Pan F, Tsugita M et al.: The protection from humoral rejection given by a liver xenograft is species-specific and non-MHC restricted. *Transplant. Proc.* 1995; 27: 270.
179. Valiunas V, Bukauskas FF, Weingart R: Conductances and selective permeability of connexin43 gap junction channels examined in neonatal rat heart cells. *Circ. Res.* 1997; 80: 708-19.
180. Van der Laan LJW, Lockey C, Griffeth BC et al.: Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 2000; 407: 90-94.
181. Wagenknecht B, Hug M, Hübner G et al.: Myokardiale Wirkungen von Mediatoren. *Intensivmedizin* 1989; 26 (Suppl. 1): 32-40.
182. Wang MW, Wright LJ, Sims MJ et al.: Presence of human chromosome 1 with expression of human decay accelerating factor (DAF) prevents lysis of mouse/human hybrid cells by human complement. *Scand. J. Immunol.* 1991; 34: 771-778.
183. Watier H, Guillaumin JM, Piller F et al.: Removal of terminal alpha-galactosyl residues from xenogeneic porcine endothelial cells. Decrease in complement-mediated cytotoxicity but persistence of IgG1-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Transplantation*. 1996; 62: 105-13.
184. Werdan K, Boekstegers P, Müller U et al.: Akute septische Kardiomyopathie: Bestandteil des Multiorganversagens in der Sepsis? *Med. Klin.* 1991; 86: 526-534.

185. Werdan K, Erdmann E: Preparation and culture of embryonic and neonatal heart muscle cells: Modifications of transport activity. *Methods Enzymol.* 1989; 173: 634-662.
186. Werdan K, Müller U, Reithmann C: Negative inotropic cascades in cardiomyocytes triggered by substances relevant to sepsis. In: Schlag G., Redl H. (eds.): *Pathophysiology of shock, sepsis and organ failure* 1993: 787-834; Springer Verlag Heidelberg.
187. Werdan K, Müller-Werdan U, Reithmann C et al.: Nitric oxide dependent and independent effects of tumor necrosis factor- α on cardiomyocyte beating activity and signal transduction pathways. In: Schlag G, Redl H (eds.): *Shock, sepsis and organ failure-nitric oxide. Fourth Wiggers-Bernard-Conference* 1994: 286-309; Springer Verlag Heidelberg.
188. Werdan K, Reithmann C: *Neonatale und embryonale Herzmuskelzellen als Myokardmodell: Regulation kardialer Rezeptoren.* Thieme; Stuttgart, New York 1987.
189. Werner J: *Biomathematik und Medizinische Statistik. 2., überarbeitete Auflage,* Urban & Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore 1992.
190. White DJG, Calne RY: Xenotransplantation. *Der Chirurg* 1996; 67:324-330.
191. White DJG, Oglesby T, Liszewski M.K et al.: Expression of human decay accelerating factor or membrane cofactor protein genes on mouse cells inhibits lysis by human complement. *Transplant. Proc.* 1992; 24: 474-476.
192. Wiedmer T, Ando S, Sims PJ: Complement C5b-9-stimulated platelet secretion is associated with a Ca^{2+} -initiated activation of cellular protein kinases. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 13674-81.
193. Xu H, Edwards N, Chen JM, Dong X, Kaplon RJ, Kwiatkowski P, Michler RE: Identification and functional analysis of human natural anti-pig xenoantibodies. *Transplant. Proc.* 1994 Jun; 26: 1365-8.
194. Zander M: *Wirkung der Präformierten Natürlichen Antikörper auf neonatale Rattenherzmuskelzellen.* Diss. LMU München 1994.
195. Zhao Z, Termington JL, Cardoso J et al.: Hyperacute rejection in the swine-to-human donor-recipient combination. *Transplantation* 1994; 57: 245.
196. Zhou XJ, Niesen N, Pawlowski I: Prolongation of survival of discordant xenografts by C6 deficiency. *Transplantation* 1990; 50: 896-898.

197. Zola H: The surface antigens of human B-lymphocytes. *Immunol. Today* 1987; 8: 308-309

Arnd Erik Autenrieth

PERSÖNLICHE INFORMATION

- Familienstand: verheiratet
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Alter: 33 Jahre
- Geburtsort: Lexington, Ky./USA
- Eltern: Prof. Dr. med. Gernot Autenrieth
Dr. med. Birgit Autenrieth, geb. Schernthaner

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

1.8.1997 bis 31.1.1999 AiP Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendheilkunde der TU Dresden

1.2.1999 bis jetzt Assistenzarzt Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendheilkunde der TU Dresden, unter anderem Betreuung einer kindernephrologischen Sprechstunde und Schichtarzt auf der pädiatrischen und neonatologischen Intensivstation.

FACHGEBIETSBEZEICHNUNG

Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin

AUSBILDUNG

- 1977 – 1981 Canisius-Grundschule München
- 1981 – 1990 Städt. Thomas-Mann-Gymnasium München, Abitur 1990
- 1990 – 1997 Medizinstudium an der LMU München, Stipendiat des Bayerischen Hochbegabtenstipendiums

TÄTIGKEITEN NEBEN DEM STUDIUM

Unter anderem Co-Assistent im anatomischen Präparierkurs

SPRACHKENNTNISSE

Englisch, französisch